

ペクチンオリゴ糖連続生産のための
回転環状反応クロマト装置の開発

課題番号：07555548

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金
基盤研究(B)(1)研究成果報告書

平成10年3月23日

研究代表者 米本年邦
東北大学工学部教授

はしがき

研究組織

研究代表者 : 米本年邦 (東北大学工学部教授)
研究分担者 : 北川明生 (宮城工業高等専門学校材料工学科講師)
研究分担者 : 櫛引正剛 (青森県産業技術開発センター技師)
研究協力者 : 北川尚美 (東北大学工学部助手)
研究協力者 : 岩村賢一郎 (東北大学工学研究科院生)

研究経費

平成7年度	4,000 千円
平成8年度	1,500 千円
計	5,500 千円

研究発表

- (1)学会誌等 (N.Shibasaki-Kitakawa et al., Kinetic Model for Oligosaccharide Hydrolysis using Suspended and Immobilized Enzymes., Biochem. Eng. J. (in printing), 平成10年3月23日)
(2)口頭発表 (K.Iwamura et al., Hydrolysis Kinetics of Oligosaccharide using Immobilized Dextranase., 化学工学会第30回秋季大会, 平成9年9月8日)

東北大学図書



00010134173

附属図書館

目次

第1章	緒論.....	1
1.1	本研究の背景および目的.....	1
1.2	既往の研究.....	2
1.3	本研究の概要.....	4
第2章	回分反応システム.....	5
2.1	均相系における酵素加水分解実験.....	5
2.1.1	実験.....	5
2.1.2	速度論モデルの構築.....	7
2.1.3	結果と考察.....	9
2.1.3.1	モデルの適用.....	9
2.1.3.2	適用結果.....	11
2.2	固定化系における酵素加水分解実験.....	14
2.2.1	実験.....	14
2.2.1.1	固定化酵素の調製.....	14
2.2.1.2	加水分解実験.....	15
2.2.1.3	分配平衡実験.....	16
2.2.2	速度論モデルの構築.....	17
2.2.2.1	基礎式の導出.....	17
2.2.2.2	無次元化.....	19
2.2.3	結果と考察.....	21
2.2.3.1	分配平衡実験.....	21
2.2.3.2	速度論モデルの適用.....	23
2.2.3.3	溶液中の各糖濃度の経時変化.....	25
2.2.3.4	担体内の各糖濃度分布と反応速度分布.....	27
2.2.3.5	モデル定数の推算値.....	30
2.2.3.6	反応速度に及ぼす各種操作因子の影響.....	33
第3章	連続反応システム.....	36
3.1	速度論モデル.....	36
3.1.1	基礎式の導出.....	36
3.1.2	無次元化.....	38
3.1.3	計算方法.....	41

3.2	実験	43
3.2.1	実験装置.....	43
3.2.2	連続加水分解実験.....	44
3.3	結果と考察.....	46
3.3.1	リアクターからの流出液中の各糖濃度.....	46
3.3.2	反応速度に及ぼす各種操作因子の検討.....	50
第4章	総括.....	53
	使用記号.....	54
	引用文献.....	56
	Appendix : 担体内の物質移動抵抗を考慮しない速度論モデル.....	57

第1章 緒言

1.1 本研究の背景および目的

近年、農業加工残滓に含まれる多糖類を酵素加水分解することにより、生理活性を有する付加価値の高いオリゴ糖が得られることが報告されている¹⁾。特に、リンゴジュースの生産工程で副成されるリンゴ搾汁残滓に含まれる多糖ペクチンを加水分解して得られる重合度4程度のペクチンオリゴ糖には、植物を雑菌類の感染から防御したり、植物培養細胞による有用物質生産を促進するなどの働きを有することが知られている¹⁾。このようなペクチンオリゴ糖を工業的規模で生産するプロセスが構築されれば、膨大な量に達する農業加工残滓を有効利用することが可能となるため、環境問題解決のための一方策になると考えられる。

酵素は一般に、生体から抽出・精製して調製されるために非常に高価なものであり、また、pH や熱に対して不安定なため失活しやすい。従って、酵素を工業規模で利用するためには、多孔性ゲルや樹脂、マイクロカプセル、膜などの不溶性の担体に固定化することにより、安定化するとともに、反応後に回収・再利用する技術が必要となる。さらに、プロセスの工業化には、このような固定化酵素を充填したカラム型リアクターによる連続生産プロセスの構築、ならびに反応の解析や予測、最適操作条件の探索などを目的とした速度論モデルの構築も重要となる。

これまでに、酵素の固定化法やそのための最適条件の探索に関しては様々な研究が行われており、数多くの知見が蓄積されている²⁾。これに対し、酵素反応に関する速度論的研究は数少なく、その大半は均相酵素反応における Michaelis-Menten 型の速度定数を求めたものである³⁾。特に、固定化酵素反応系では、担体内外の物質移動抵抗が存在するので、酵素固有の速度定数を実験的に決定することが困難であり、見かけの速度定数を求めるための種々の方法が検討されているにすぎない⁴⁾⁻⁶⁾。

一方、高重合度の糖類の酵素加水分解は、種々の大きさをもつ糖の生成やその糖のさらなる分解を含む逐次的で複雑な反応であるため、反応機構の解析が極めて困難である。これまで多糖類の酵素加水分解反応に関していくつかの速度論モデルが報告されているが、そのほとんどは回分反応器を用いた均相酵素反応に関するものである⁷⁾⁻¹⁰⁾。また、これらの研究では極度に簡略化した反応機構に基づいて速度論モデルを構築しているにすぎず、多糖の加水分解によって生じる種々の分子量の糖を定量的に分析することが困難であるた

め、実験的な検証もほとんど行われていない。

本研究では、多糖ペクチンの酵素加水分解プロセス設計のための基礎的研究として、まず、糖類の逐次的な酵素加水分解プロセスの解析や予測を可能とする、より現実的な反応機構に基づいた速度論モデルを構築する。そして、モデル系として、基質に逐次加水分解が起こる最も小さな糖であり、かつ、分析の容易な重合度6のオリゴ糖（イソヘキサマルトース）を、酵素にこの基質を加水分解するエンドデキストラナーゼを取り上げ、回分反応器を用いて種々の条件下で均相酵素加水分解実験を行い、モデルの妥当性を実験的に検証する。次に、この酵素を固定化し、同様に回分反応器を用いて種々の条件下で固定化酵素加水分解実験を行い、固定化系における速度論モデルを構築する。さらに、この酵素加水分解プロセスの連続化を目的として、固定化酵素を充填したカラム型リアクターを設計・製作し、種々の条件下で連続加水分解実験を行う。そして、本連続反応プロセスに関する数学モデルを構築し、実験結果と合わせてプロセスの最適な運転条件を探索する。

1.2 既往の研究

これまでに多糖類の酵素加水分解に関していくつかの速度論モデルが報告されている⁷⁾。Fujii らは、エンド型活性を有する α -アミラーゼとエキソ型活性を有するグルコアミラーゼを用いたデンプンの加水分解に関する速度論モデルを構築している⁸⁾。エンド型活性を有する酵素は、基質となる多糖の内側の α -1,6 結合をランダムに切断する性質を持つため、その分解生成物は広い分子量分布を示すが、エキソ型活性を有する酵素は、多糖の末端基の α -1,6 結合から順に切断する性質を持つため、その分解生成物は単糖あるいは二糖であることが知られている。彼らは、基質の分子量が十分に大きい場合、エンド型酵素とエキソ型酵素の反応性は等しいが、エンド型酵素による加水分解が進行するにつれてエキソ型酵素に分解される基質濃度が増えると仮定し、Michaelis-Menten 型の反応機構に基づき、還元糖の生成速度を次式で表している。

$$\frac{dC_R}{dt} = \frac{V_{\max}^{\text{exo}} C_S(0) e^{\kappa t}}{K_m^{\text{exo}} + C_S(0) e^{\kappa t}} + \frac{V_{\max}^{\text{endo}} C_S(0)}{K_m^{\text{endo}} + C_S(0)} \quad (2-1)$$

ここで、右辺の第一項はエキソ型酵素に分解されて生じる単糖の生成速度であり、第二項はエンド型酵素に分解されて生じる還元糖の生成速度である。 K_m^{exo} 、 V_{\max}^{exo} はエキソ型酵素に関する Michaelis 定数と最大反応速度、 K_m^{endo} 、 V_{\max}^{endo} はエンド型酵素に関する Michaelis 定数と最大反応速度、 C_R は還元糖の濃度、 $C_S(0)$ は初期基質濃度、 κ はエキソ型酵素に関する最大反応速度と Michaelis 定数の比、すなわち $V_{\max}^{\text{exo}}/K_m^{\text{exo}}$ である。この速度論モデル

は”lumped model”と呼ばれており、この系で生成する種々の分子量を有する糖をすべて1つの基質としてまとめて考慮している。彼らは、実際に前述した2種類の酵素を用いて加水分解実験を行い、分解生成物として還元糖の総量のみを分析し、Lineweaver-Burk plotにより求めた各酵素の最大反応速度および Michaelis 定数を用いて(2-1)式により還元糖の生成速度を求めている。このモデルによる計算値は、反応の初期段階でのみ実験結果と一致しているが、極度に簡略化されているため、生成物の分子量分布などを予測することができない。

これに対して Suga らは、多糖の逐次的な加水分解反応を表現するためには”lumped model”では限界があることを認識し、基質や生成物の分子量分布を考慮した”distributed model”を提案している⁹⁾。彼らは、重合度 $i(i=1, 2, 3, \dots\infty)$ の糖の生成や消費をそれぞれ Michaelis-Menten 型の反応速度式で表現しており、エンド型とエキソ型酵素が混在している場合の一般化されたモデル式として次式を提案している。

$$\frac{dC_{Si}}{dt} = -\frac{V_{\max}^{endo} (i-1)C_{Si}}{K_m^{endo} + \sum_{i=2}^{\infty} (i-1)C_{Si}} + \frac{2V_{\max}^{endo} \sum_{j=i+1}^{\infty} C_{Sj}}{K_m^{endo} + \sum_{i=2}^{\infty} (i-1)C_{Si}} - \frac{V_{\max}^{exo} C_{Si}}{K_m^{exo} + \sum_{i=2}^{\infty} C_{Si}} + \frac{V_{\max}^{exo} C_{Si+1}}{K_m^{exo} + \sum_{i=2}^{\infty} C_{Si}} \quad (2-2)$$

ここで、右辺の第一、二項はエンド型酵素による基質の消費や生成を、第三、四項はエキソ型酵素による基質の消費や生成を示している。 C_{Si} は重合度 i の糖濃度である。このモデルでは、”lumped model”よりも実際の複雑な現象に近い反応機構を考えているが、反応生成物の分子量分布を実験的に測定することが困難であるため、実験によるモデルの検証は行われていない。さらに Okazaki らは、Suga らのモデルを拡張することにより、反応活性が異なる3種類の酵素セルラーゼを用いたセルロースの加水分解に関する速度論モデルを構築している¹⁰⁾。彼らは、実験的に観察される各酵素同士の相互作用を述べる基本的なモデル定数を定量化して論じているが、Suga らの場合と同様に、基質や生成物の分子量分布に関する実験的な測定が困難であることから、実験的な検証は行っていない。

Dean らは、Suga らのモデルを改良することにより新たな速度論モデルを構築している¹¹⁾。彼らは、基質である多糖の主鎖にある程度の間隔で枝分かれ部分があり、その部分は酵素によって加水分解されない、また、3糖以下はエンド型酵素によって分解されないというさらに現実的な事象を取り入れた。モデル式は、Michaelis-Menten 型の反応機構を考慮し、次式で表される。

$$\frac{dC_{S_i}}{dt} = -\frac{V_{\max}^{endo} (i-3)C_{S_i}}{K_m^{endo} + \sum_{i=4}^{\infty} (i-3)C_{S_i}} + \frac{2V_{\max}^{endo} \sum_{j=i+2}^{\infty} C_{S_j}}{K_m^{endo} + \sum_{i=4}^{\infty} (i-3)C_{S_i}} - \frac{V_{\max}^{exo} C_{S_i}}{K_m^{exo} + \sum_{i=2}^{\infty} C_{S_i}} + \frac{V_{\max}^{exo} C_{S_{i+1}}}{K_m^{exo} + \sum_{i=2}^{\infty} C_{S_i}} \quad (2-3)$$

Suga らの場合と同様に、右辺の第一、二項はエンド型酵素による基質の消費や生成を、第三、四項はエキソ型酵素による基質の消費や生成を示している。彼らは、エンド型およびエキソ型デキストラナーゼを用いてデキストランの加水分解実験を行っている。彼らのモデルによる計算値は、反応時間が短い場合では実験結果と一致しているが、長い場合では一致しなかった。彼らは、この原因を実際の反応では酵素阻害などのより複雑な現象が起こっているためであると考えている。このように現在のところ、多糖の酵素加水分解を良好に表現できる速度論モデルは構築されていない。

1.3 本研究の概要

本研究の概要を以下に示す。

第1章では、本研究の背景および目的について述べるとともに、本研究の概要を示す。

第2章では、回分反応器を用いて、種々の条件下で均相酵素加水分解実験を行い、この系に関する速度論モデルを構築する。次に、この酵素を固定化し、同様に回分反応器を用いて種々の条件下で固定化酵素加水分解実験を行い、固定化系における速度論モデルを構築する。

第3章では、固定化系に関する速度論モデルを拡張することにより連続酵素加水分解システムに関する速度論モデルを構築し、このモデルに基づき、固定化酵素を充填したカラム型リアクターを設計・製作する。また、このリアクターを用いて、種々の条件下で連続加水分解実験を行い、モデルの妥当性を検討するとともに最適操作条件を探索する。

第4章では、本研究を総括する。

第2章 回分反応システム

2.1 均相系における酵素加水分解実験

均相系における酵素加水分解実験を種々の条件下で回分反応器を用いて行い、本酵素加水分解システムを表現するための速度論モデルを構築する。

2.1.1 実験

基質には、逐次的な分解経路が比較的簡単で分析が容易なデキストラン由来のイソマルトヘキサオース（6糖）を用いた。酵素には、*Penicillium* sp. 由来のエンドデキストラナーゼを用いた。回分反応器には 500cm³ の三角フラスコを用い、反応液体積は 100cm³ とした。均相酵素反応は、37℃の恒温槽中、毎分 60 往復の速度でフラスコを振盪させながら行った。初期基質濃度および遊離酵素濃度を変化させた。反応条件を Table 2-1 に示す。反応は所定濃度の基質溶液に所定量の酵素溶液を滴下することにより開始した。サンプリングは適当な時間間隔で 1.0cm³ の反応液をマイクロピペットを用いて採取することにより行った。採取したサンプルは 0.02N NaOH 0.5cm³ を加えて速やかに反応を停止させた後、0.02N HCl 0.5cm³ を加えて中和した。さらに、サンプルから酵素を取り除くため、分画分子量が 10000 である微量試料用限外濾過膜(日本ミリポア(株)モルカットⅡ)を用いて濾過した。ただし、この限外濾過膜には保存剤としてグリセリンが含まれており、糖濃度分析の際に不純物として検出されるため、予め一晚超純水に浸すことによりグリセリンを取り除いた。

分析は、濾過後のサンプルの各糖濃度を、示差屈折計を検出器とした分配吸着式高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。Table 2-2 と 2-3 に分析装置の仕様と分析条件を示す。

Table 2-1 Reaction conditions in suspended enzyme system.

反応温度	: 37°C
反応液体積	: 100 cm ³
初期基質濃度	: 1.3, 1.7 × 10 ⁻⁴ mol•dm ³ -liq
遊離酵素濃度	: 1.16, 2.1 mg•dm ³ -liq

Table 2-2 Specification of analyzer.

示差屈折計	: 島村製作所(株) YRU-880mdget
インテグレーター	: 日立製作所(株) D-7500
オートサンプラー	: 日立製作所(株) L-7200
インテリジェントポンプ	: 日立製作所(株) L-7100
カラム	: 日立製作所(株) NH-C18

Table 2-3 Analysis conditions.

Eluent	: 超純水 100%
Flow Rate	: 1cm ³ •min ⁻¹
Column Temp.	: 60°C

2.1.2 速度論モデルの構築

エンドデキストラナーゼによるイソマルトヘキサオース(6 糖)の加水分解反応機構を Fig.2-1 に示す。図の黒丸はグルコース1つを、 E は酵素を、 k_i は反応速度定数($i=1,2,3$)を表す。デキストラナーゼはエンド型活性を示すため、基質末端以外の α -1,6 グリコシド結合に対する加水分解反応を触媒する。従って、6 糖は図の点線の示す 3 通りの位置(II, I, II)で酵素により α -1,6 グリコシド結合を切断され、3 糖あるいは 2 糖と 4 糖に分解され、さらに 4 糖は 2 糖に分解されることになる。本加水分解反応に関して、基質が酵素と複合体を形成して、生成物を生成するという Michaelis-Menten 型の反応機構を考えている。

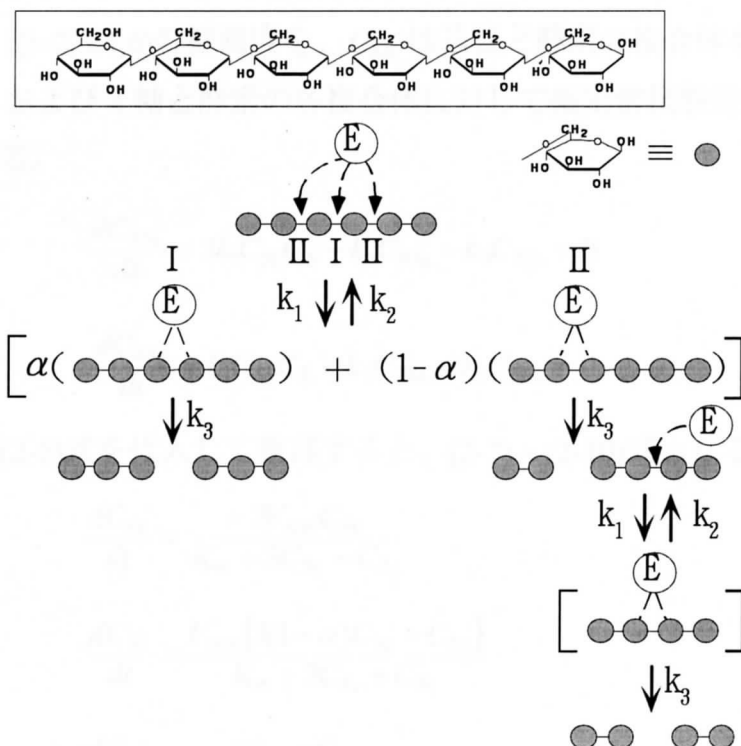


Fig.2-1 Michaelis-Menten type hydrolysis process of isomaltohexaose using endo-dextranase.

Dean ら¹¹⁾は、本反応のような多糖類のエンド型酵素加水分解に対して数学モデルを構築した。彼らのモデルでは、酵素が基質末端以外のどの α -1,6 グリコシド結合も同じ確率で切断するという仮定が用いられている¹¹⁾。しかし、そのモデルでは実験結果との一致が得られなかったことが報告されている。そこで本研究では、Fig.2-1 に示すように酵素が 6 糖の I の位置で α -1,6 グリコシド結合を切断する(3 糖が生成する)確率を α として考慮することにより新たな速度論モデルを構築する。さらに、モデルの簡略化のために 6 糖および 4 糖の反応速度定数 k_1, k_2, k_3 がそれぞれ等しいと仮定する。

これより、各糖の反応速度は(2-1)-(2-4)式のように表される。

$$v_6 = \frac{dC_{S_6}}{dt} = -3k_1C_{S_6}C_E + k_2C_{ES_6} \quad (2-1)$$

$$v_4 = \frac{dC_{S_4}}{dt} = (1-\alpha)k_3C_{ES_6} - k_1C_{S_4}C_E + k_2C_{ES_4} \quad (2-2)$$

$$v_3 = \frac{dC_{S_3}}{dt} = 2\alpha k_3C_{ES_6} \quad (2-3)$$

$$v_2 = \frac{dC_{S_2}}{dt} = (1-\alpha)k_3C_{ES_6} + 2k_3C_{ES_4} \quad (2-4)$$

ここで、 C_{S_i} は重合度 $i(i=2,3,4,6)$ の糖濃度を、 C_{ES_i} は基質と酵素の複合体を表す。

次に、6 糖と酵素、および 4 糖と酵素の各複合体に対して擬定常状態近似を適用すると、(2-5)、(2-6)式が得られる。

$$\frac{dC_{ES_6}}{dt} = 3k_1C_{S_6}C_E - k_2C_{ES_6} - k_3C_{ES_6} = 0 \quad (2-5)$$

$$\frac{dC_{ES_4}}{dt} = k_1C_{S_4}C_E - k_2C_{ES_4} - k_3C_{ES_4} = 0 \quad (2-6)$$

(2-1) ~ (2-4)式に(2-5), (2-6)式を代入して整理すると、(2-7) ~ (2-10)式となる。

$$\frac{dC_{S_6}}{dt} = \frac{-3V_{\max}C_{S_6}}{K_m + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (2-7)$$

$$\frac{dC_{S_4}}{dt} = \frac{V_{\max} [3(1-\alpha)C_{S_6} - C_{S_4}]}{K_m + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (2-8)$$

$$\frac{dC_{S_3}}{dt} = \frac{6V_{\max}\alpha C_{S_6}}{K_m + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (2-9)$$

$$\frac{dC_{S_2}}{dt} = \frac{V_{\max} [3(1-\alpha)C_{S_6} + 2C_{S_4}]}{K_m + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (2-10)$$

ここで、 $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$, $V_{\max} = k_3C_E(0)$ であり、 $C_E(0)$ [mg•dm⁻³-liquid] は反応溶液中の初期遊離酵素濃度である。各糖濃度 C_{S_i} ($i=2,3,4,6$) [mol•dm⁻³-liquid] の経時変化は実験的に求めるため、本モデルの未知定数は最大反応速度 V_{\max} [mol•dm⁻³-liquid•min⁻¹]、Michaelis 定数 K_m [mol•dm⁻³-liquid]、6 糖が 3 糖に分解される確率 α の 3 つとなる。ここで、 $\alpha = 1/3$ とした場合の本モデル式は、3 つの α -1,6 グリコシド結合の切断される確率が等しいとした Dean らのモデル式¹¹⁾と一致することになる。

2.1.3 結果と考察

2.1.3.1 モデルの適用

前節で構築した速度論モデルの未知定数は V_{max} 、 K_m 、 α の3つである。ここで、 V_{max} は初期酵素濃度 $C_E(0)$ [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ -liquid]によって異なる値となるが、この V_{max} を $C_E(0)$ で割った値、すなわち単位酵素量あたりの最大反応速度 $V_{max}' (=V_{max}/C_E(0))$ は酵素自身の固有の値であり、一定であると考えられる。そこで、新たに V_{max}' 、 K_m および α を未知定数として、実験値とのフィッティングを行った。Fig.2-2 に計算手順のフローチャートを示す。これら3つの未知定数は、(2-11)式で定義される各糖濃度の計算値と異なる3つの条件下での実験値との相対誤差の二乗和である S を最小にするように Simplex 法により推算された。糖濃度の計算値は、連立微分方程式(2-7)~(2-10)式を Runge-Kutta 法を用いて数値的に解くことにより求めた。この際の時間刻みは 60sec とした。

$$S = \sum \left[\frac{C_{Si,calc} - C_{Si,exp}}{(C_{Si,calc} + C_{Si,exp})/2} \right]^2 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-11)$$

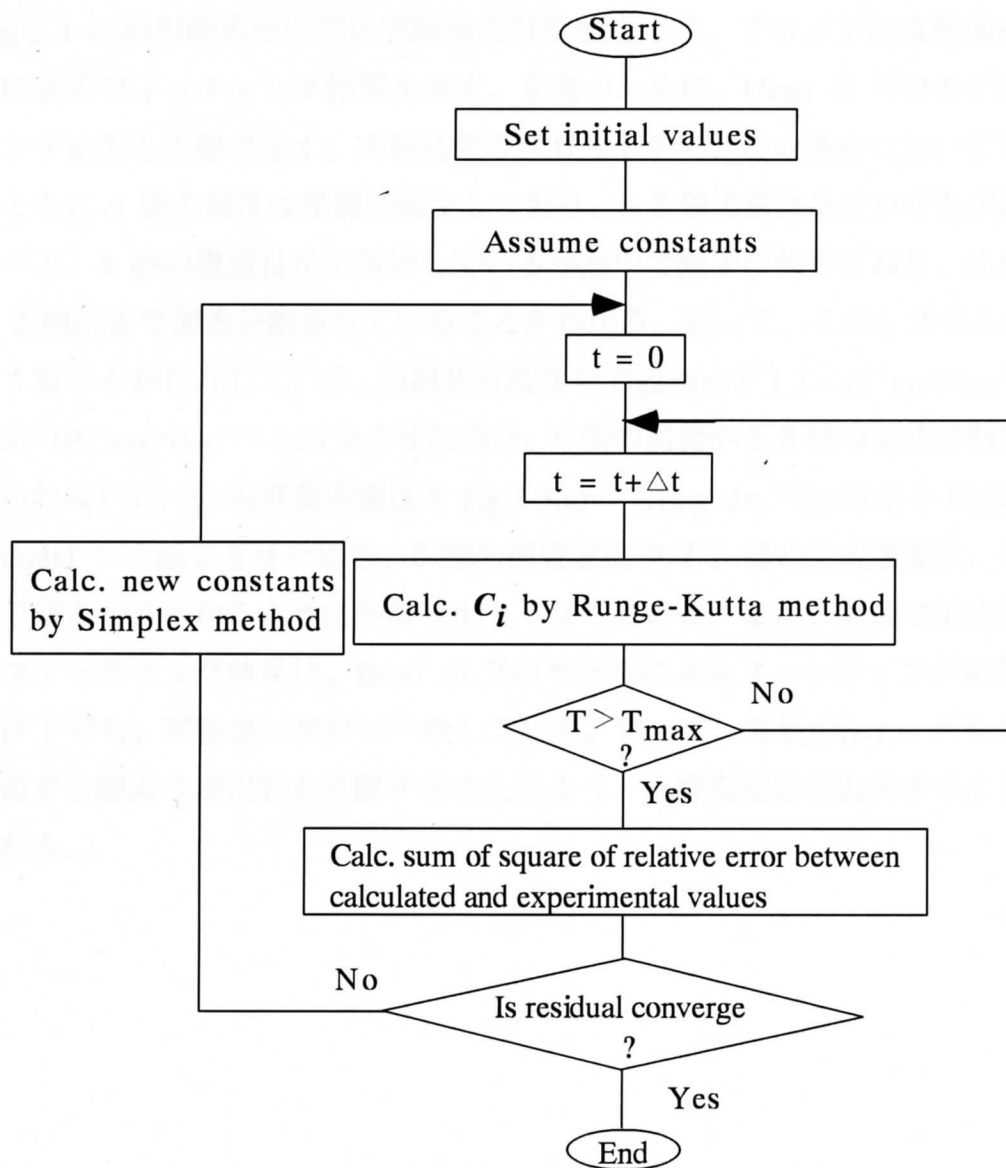


Fig.2-2 Flowchart for estimations of constants.

2.1.3.2 適用結果

Fig.2-3 に均相酵素反応での実験値と計算値を示す。プロットは実験値を、実線は本モデルによるフィッティング結果を表す。参考のために、Dean ら¹¹⁾のモデルによるフィッティング結果も点線で示す。実験結果のプロットから、どの条件においても反応時間の経過とともに 6 糖の濃度は単調に減少しており、3, 2 糖の濃度はそれぞれ単調に増加している。一方、4 糖の濃度は始め増加しているが途中で減少に転じており、生成した 4 糖がさらに 2 糖にまで加水分解されていることがわかる。従って、このシステムには最終的に 2 糖と 3 糖のみが存在している。初期基質濃度を Fig.2-3(a)の $1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ から Fig.2-3(b)の $1.3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ へと減少させた場合、6 糖の消費や 2, 3 糖の生成の傾向にあまり違いは見られない。一方、初期酵素濃度を Fig.2-3(a)の $2.1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{liquid}$ から Fig.2-3(c)の $1.16 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{liquid}$ へと減少させた場合、6 糖の消費速度や 2, 3 糖の生成速度は、各糖濃度の経時変化の傾きからわかるようになんかなり小さくなっている。また、実線で示された本モデルによるフィッティング結果は、Dean ら¹¹⁾のモデルによるフィッティング結果と比べて、どの条件下でも、実験値と良好に一致している。従って、基質の α -1,6 グリコシド結合の切断に関する酵素の選択性を考慮することにより、本酵素反応を表現することができたと考えられる。

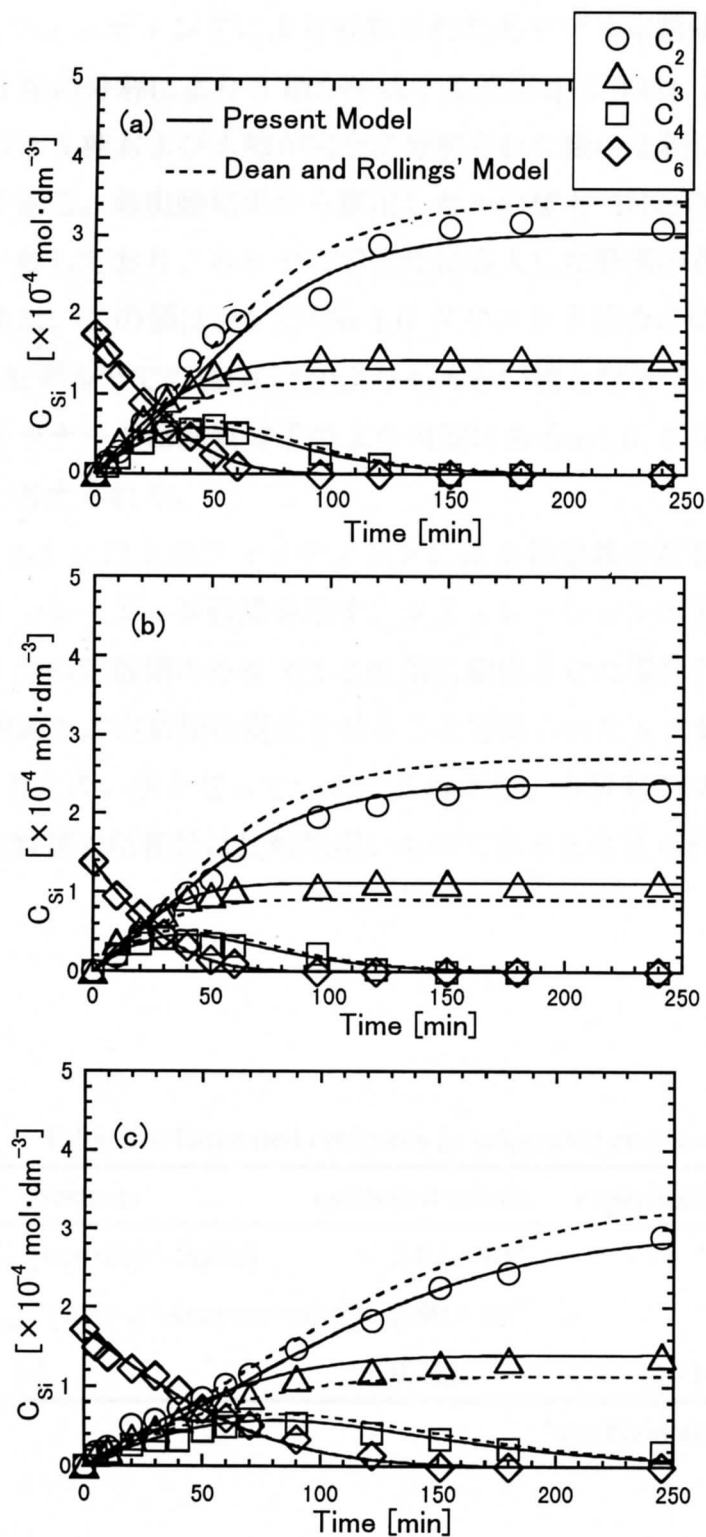


Fig.2-3 Experimental and calculated results in suspended enzyme system.

(a) $C_6(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_E(0) = 2.1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

(b) $C_6(0) = 1.3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_E(0) = 2.1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

(c) $C_6(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $C_E(0) = 1.16 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Table 2-4 にフィッティングにより推算された各モデル定数値を示す。本モデルの新たな定数である 6 糖の分解により 3 糖が生成する確率 α は 0.411 と推算された。この値は、実験結果に基づき 6 糖および 4 糖が完全に分解された後の 2 糖に対する 3 糖の割合からも求めることができる。各実験結果から算出した α の値も Table 2-4 に示す。 α の推算値は実験値とほぼ一致しており、本モデルで新たに導入した酵素の選択性の概念が妥当であると考えられる。また、この値は、3 つの α -1,6 グリコシド結合の切断される確率が等しいとした Dean らのモデル¹¹⁾での値($\alpha=1/3$)よりも大きい値となっている。これはエンド活性を有するデキストラナーゼは基質分子のより内側にある α -1,6 グリコシド結合に配位しやすいためであると考えられる。

また、Table 2-5 に以上のフィッティングによる各定数の推算値の妥当性を検討するために行ったシミュレーション結果を示す。シミュレーションの方法は、各定数値を推算値で一定とし、1 つの定数値のみを 0.5~2.0 倍に変化させた場合の実験値との相対誤差の二乗和 S の値を求めた。定数値を変化させることで得られた S の値は最小値 S_{min} よりも少なくとも 16% 以上大きい値となっている。これより、本研究でフィッティングにより推算されたモデル定数値の信頼性は比較的高いものであると考えられる。

Table 2-4 Estimated constants in suspended enzyme system.

constants	estimated values	experimental values
K_m [mol•dm ⁻³ -liquid]	2.01×10^{-4}	*
V_{max} ' [mol•g ⁻¹ -enzyme•min ⁻¹]	2.90×10^{-3}	*
α [-]	0.411	0.41~0.42

*unobtainable

Table 2-5 Sensitivity of model constants in suspended enzyme system.

constants	value	S	deviation (S - S _{min})/S _{min} × 100
K_m	1.01×10^{-4}	106.2	+31.3%
	2.01×10^{-4}	80.9	minimum
	4.02×10^{-4}	94.5	+16.7%
V_{max}	1.45×10^{-3}	123.6	+52.7%
	2.90×10^{-3}	80.9	minimum
	5.80×10^{-3}	160.2	+97.9%
α	0.206	101.8	+25.8%
	0.411	80.9	minimum
	0.822	173.4	114.3%

2.2 固定化系における酵素加水分解実験

固定化酵素を作成し、均相系と同様に回分反応器を用いて種々の条件下で酵素加水分解実験を行い、本固定化酵素加水分解システムを表現するための速度論モデルを構築する。

2.2.1 実験

2.2.1.1 固定化酵素の調製

基質および酵素は均相系と同様である。担体には *N*-サクシルイミドエステルにより活性化された多孔性メタクリル酸共重合体ビーズである Affi-Prep10(バイオラット社製)を用いた。この担体の公称の粒径は 50 μ m、孔径は 0.1 μ m である。Affi-Prep10 は、Fig.2-4 に示すような共有結合反応により酵素のアミノ基と迅速に反応し、安定なアミド結合を形成することにより、酵素を固定化することができる。

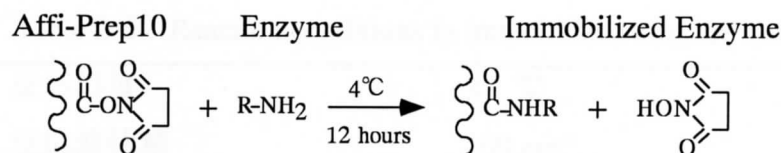


Fig.2-4 Covalently reaction of enzyme and support.

Affi-Prep10 への酵素の固定化手順を以下に示す。

- 1) Affi-Prep10 はイソプロパノールで膨潤されているため、これを除去するため一晩超純水に浸す。
- 2) 5.0 g の Affi-Prep10 を所定濃度(2.32 mg•cm⁻³, 1.6 mg•cm⁻³)の酵素溶液に加え、4℃で
おだやかに 12 時間攪拌しながら共有結合反応させる。
- 3) 酵素を固定化した Affi-Prep10 を取り出し、超純水で洗浄した後、反応に用いる。
- 4) 残った酵素溶液中の残存酵素濃度を 595nm での吸光度測定により求め、Affi-Prep10
に固定化された酵素量を算出する。

2.2.1.2 加水分解実験

固定化酵素を用いた加水分解実験は、均相系の場合と同様に、回分反応器に 500cm³ の三角フラスコを用い、反応液体積を 100cm³ とし、37℃の恒温槽中、毎分 60 往復の速度で振盪させて行った。初期基質濃度、固定化担体量および担体あたりの酵素濃度を変化させた。反応条件を Table 2-6 に示す。予備実験として、振盪速度を変化させた条件下でも同様に実験を行い、その振盪条件が加水分解反応速度に影響を与えないことが確認されている。反応は所定濃度の基質溶液に、所定量の固定化酵素を加えることにより開始した。サンプリングは適当な時間間隔で 1.0cm³ の反応液をマイクロピペットを用いて採取することにより行った。採取したサンプルは 0.02N NaOH 0.5cm³を加えて速やかに反応を停止させた後、0.02N HCl 0.5cm³を加えて中和し、さらに、酵素を取り除くため、分画分子量が10000である微量試料用限外濾過膜(日本ミリポア(株)モルカットⅡ)を用いて濾過した。この場合にも、予め一晩超純水に浸すことによりグリセリンを取り除いた限外濾過膜を用いた。そして、各サンプル中の各糖濃度の分析を HPLC を用いて行った。分析条件も均相系と同様である。

Table 2-6 Reaction conditions in immobilized enzyme system.

反応温度	:	37 °C
反応液体積	:	100 cm ³
初期基質濃度	:	1.3~2.0×10 ⁻⁴ mol•dm ⁻³ -liquid
固定化担体量	:	1.0, 1.5 g
酵素濃度	:	9.5, 13.5 mg•cm ⁻³ -particle

2.2.1.3 分配平衡実験

固定化酵素を用いて加水分解実験を行う際、液相中の糖濃度と固定化担体中の糖濃度とは、厳密には一致していないと考えられる。従って、液相と担体間の糖濃度の関係を知るために、両者間の分配平衡実験を以下の手順で行った。実験条件を Table 2-7 に示す。

- 1) 所定濃度の基質溶液 $C_{Si}(0)$ に所定量 W_P の酵素を固定化していない担体を加え、固定化酵素反応と同様の条件下で恒温槽中で振盪する。
- 2) 平衡に達した時点(24 時間経過後)での溶液中の糖濃度 C_{Si} を HPLC により分析する。
- 3) この溶液中の糖濃度に基づき、次式により担体中の糖濃度を求める。この際、実際の担体は多孔性のポリマーであるが、これを均一なゲルであると仮定し、Fig.2-5 に示すように担体中の糖濃度は一定であると考えている。

$$\overline{C_{Si}} = \frac{(C_{Si}(0) - C_{Si})V_l}{W_P / \rho} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-12)$$

ここで、 V_l [dm³-liquid]は溶液体積、 ρ [g-particle•dm⁻³-particle]は担体密度である。

Table 2-7 Experimental conditions of distribution equilibrium experiment.

基質	:	6 糖、2 糖
反応温度	:	37 °C
反応液体積	:	50 cm ³
初期基質濃度	:	1.5, 2.0×10 ⁻⁴ mol•dm ⁻³ -liquid
担体量	:	3.0, 4.0 g

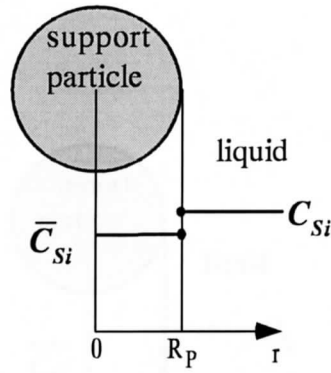


Fig.2-5 Schematic illustration of equilibrium saccharide concentration in immobilized enzyme system.

2.2.2 速度論モデルの構築

2.2.2.1 基礎式の導出

固定化酵素による糖類の加水分解に関する速度論モデルを構築するにあたり、モデルの簡略化のため、以下のような仮定を施す。

- 1) 液相は完全混合である。
- 2) 担体粒子は均一かつ球形で、その半径は一定である。
- 3) 酵素は担体内に均一に固定化されている。
- 4) 反応器が十分に混合された状態であるため、外部物質移動抵抗は存在しない。
- 5) 各糖濃度に関して、液相と担体表面の間には、(2-13)式で与えられる線形の分配平衡が成り立っている。

$$\bar{C}_{Si} \Big|_{r=R_p} = H C_{Si} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-13)$$

ここで、 $H [\text{dm}^3\text{-particle} \cdot \text{dm}^{-3}\text{-liquid}]$ は分配平衡定数である。

- 6) 担体内部の各糖の移動速度は Fick の第一法則に従う。各糖の有効拡散係数 D_i^{eff} は (2-14)式で与えられる。

$$D_i^{\text{eff}} = A \times (M_{wi})^{-B} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-14)$$

ここで、 $A [\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$, $B [-]$ は回帰係数である。

これらの仮定に基くと、担体近傍の糖濃度分布は Fig.2-6 のようになる。

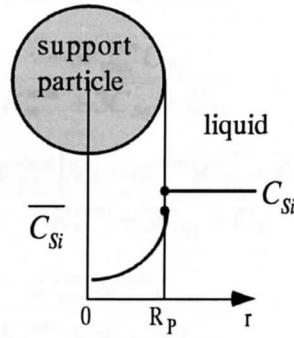


Fig.2-6 Saccharide concentration distribution in immobilized enzyme system.

まず、各糖に関する反応器内の物質収支は、仮定 1) ~3) より(2-15)式で、初期条件は(2-16)式で表される。

$$\frac{dC_{Si}}{dt} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{d\langle C_{Si} \rangle}{dt} - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \langle \bar{v}_i \rangle = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-15)$$

$$\text{i.c. } t=0; C_{Si} = \begin{cases} C_{Si}(0) (i=6) \\ 0 (i=2,3,4) \end{cases} \quad (2-16)$$

ここで、 ε は全反応体積に占める反応溶液の割合であり、(2-17)式のように定義される。

$$\varepsilon = \frac{V_l}{V_l + V_p} \quad (2-17)$$

V_l は反応溶液体積を、 V_p は担体体積を表す。また、担体中の平均糖濃度 $\langle C_{Si} \rangle$ および平均反応速度 $\langle \bar{v}_i \rangle$ は(2-18)式、(2-19)式で定義される。

$$\langle C_{Si} \rangle = \frac{\int_0^{R_p} C_{Si} 4\pi r^2 dr}{\frac{4}{3}\pi R_p^3} = \frac{3}{R_p^3} \int_0^{R_p} C_{Si} r^2 dr \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-18)$$

$$\langle \bar{v}_i \rangle = \frac{\int_0^{R_p} \bar{v}_i 4\pi r^2 dr}{\frac{4}{3}\pi R_p^3} = \frac{3}{R_p^3} \int_0^{R_p} \bar{v}_i r^2 dr \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-19)$$

一方、各糖の担体内における反応速度 \bar{v}_i は 2.1.2 で構築した均相系の速度論モデルの(2-7)

~(2-10)式に基づき、担体体積基準の最大反応速度 V_{\max}^{imm} [mol•dm⁻³-particle•min⁻¹]、担体体積基準の Michaelis 定数 K_m^{imm} [mol•dm⁻³-liquid]、および担体内の各糖濃度 $\overline{C_{S_i}}$ [mol•dm⁻³-particle]を用いて(2-20)~(2-23)式のように表わされる。

$$\overline{v_6} = \frac{-3V_{\max}^{imm}\overline{C_{S_6}}}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S_6}} + \overline{C_{S_4}}} \quad (2-20)$$

$$\overline{v_4} = \frac{V_{\max}^{imm} [3(1 - \alpha^{imm})\overline{C_{S_6}} - \overline{C_{S_4}}]}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S_6}} + \overline{C_{S_4}}} \quad (2-21)$$

$$\overline{v_3} = \frac{6V_{\max}^{imm}\alpha^{imm}\overline{C_{S_6}}}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S_6}} + \overline{C_{S_4}}} \quad (2-22)$$

$$\overline{v_2} = \frac{V_{\max}^{imm} [3(1 - \alpha^{imm})\overline{C_{S_6}} + 2\overline{C_{S_4}}]}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S_6}} + \overline{C_{S_4}}} \quad (2-23)$$

ここで、 $\alpha^{imm}[-]$ は固定化系における6糖が3糖に分解される確率である。

また、各糖に関する担体内の物質収支は、仮定6)に基づき、式(2-24)式で表される。

$$\frac{\partial \overline{C_{S_i}}}{\partial t} = D_i^{eff} \left(\frac{2}{r} \frac{\partial \overline{C_{S_i}}}{\partial r} + \frac{\partial^2 \overline{C_{S_i}}}{\partial r^2} \right) + \overline{v_i} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-24)$$

ここで、初期条件は(2-25)式、境界条件は仮定4), 5)より(2-26)、(2-27)式で表される。

$$\text{i.c.} \quad 0 \leq r \leq R_p; \quad \overline{C_{S_i}}(0) = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-25)$$

$$\text{b.c.} \quad r=0; \quad \frac{\partial \overline{C_{S_i}}}{\partial r} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-26)$$

$$r=R_p; \quad \overline{C_{S_i}} = HC_{S_i} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-27)$$

以上の(2-15)~(2-27)の基礎式を数値的に解くことにより、溶液中および担体中の各糖濃度を計算することができる。

2.2.2.2 無次元化

以下の無次元数を定義する。

$$Z_i = \frac{C_{S_i}}{C_{S_6}(0)} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-28)$$

$$\overline{Z_i} = \frac{\overline{C_{S_i}}}{C_{S_6}(0)} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-29)$$

$$T = \frac{D_6^{eff}}{R_p^2} t \quad (2-30)$$

$$\kappa = \frac{K_m^{imm}}{C_{S_6}(0)} \quad (2-31)$$

$$\overline{\chi_i} = \frac{\overline{v_i}}{V_{max}^{imm}} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-32)$$

$$R = \frac{r}{R_P} \quad (2-33)$$

$$\phi = \frac{R_P^2 V_{max}^{imm}}{D_6^{eff} C_{S_6}(0)} \quad (2-34)$$

ここで、 $C_{S_6}(0)$ は 6 糖の初期濃度、 D_6^{eff} は 6 糖の有効拡散係数である。

これらの変数を用いることにより、反応器内の物質収支式(2-15)式、および初期条件(2-16)式は以下のように無次元化される。

$$\frac{dZ_i}{dT} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{d\langle \overline{Z_i} \rangle}{dT} - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \phi \langle \overline{\chi_i} \rangle = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-35)$$

$$\text{i.c. } T=0; \quad Z_i = \begin{cases} Z_i(0) & (i=6) \\ 0 & (i=2,3,4) \end{cases} \quad (2-36)$$

担体内の平均糖濃度(2-18)式および平均反応速度(2-19)式は以下のように無次元化される。

$$\langle \overline{Z_i} \rangle = 3 \int_0^1 \overline{Z_i} R^2 dR \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-37)$$

$$\langle \overline{\chi_i} \rangle = 3 \int_0^1 \overline{\chi_i} R^2 dR \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-38)$$

また、担体内の微分物質収支式(2-24)は以下のように無次元化される。

$$\frac{\partial \overline{Z_i}}{\partial T} = \frac{D_i^{eff}}{D_6^{eff}} \left(\frac{2}{R} \frac{\partial \overline{Z_i}}{\partial R} + \frac{\partial^2 \overline{Z_i}}{\partial R^2} \right) + \phi \overline{\chi_i} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-39)$$

初期条件(2-25)式および境界条件(2-26),(2-27)式は以下のように無次元化される。

$$\text{i.c. } T=0, 0 \leq R \leq 1; \quad \overline{Z_i}(0) = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-40)$$

$$\text{b.c. } R=0; \quad \frac{\partial \overline{Z_i}}{\partial R} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-41)$$

$$R=1; \quad \overline{Z_i} = HZ_i \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-42)$$

各糖の反応速度式(2-20)~(2-23)は以下のように無次元化される。

$$\overline{\chi}_6 = \frac{-3\overline{Z}_6}{\overline{Z}_4 + 3\overline{Z}_6 + \kappa} \quad (2-43)$$

$$\overline{\chi}_4 = \frac{3(1 - \alpha^{imm})\overline{Z}_6 - \overline{Z}_4}{\overline{Z}_4 + 3\overline{Z}_6 + \kappa} \quad (2-44)$$

$$\overline{\chi}_3 = \frac{6\alpha^{imm}\overline{Z}_6}{\overline{Z}_4 + 3\overline{Z}_6 + \kappa} \quad (2-45)$$

$$\overline{\chi}_2 = \frac{3(1 - \alpha^{imm})\overline{Z}_6 + 2\overline{Z}_4}{\overline{Z}_4 + 3\overline{Z}_6 + \kappa} \quad (2-46)$$

これより、本モデルの未知定数は V_{\max}^{imm} 、 K_m^{imm} 、 A 、 B 、 H 、 α^{imm} の 6 つとなる。ここで、 V_{\max}^{imm} は均相系の場合と同様に担体あたりの酵素濃度 $C_E^{imm}(0)$ に依存して変化する値である。そのため、酵素固有の値である単位酵素量あたりの最大反応速度 V_{\max}^{imm} 、 $(=V_{\max}^{imm}/C_E^{imm}(0))$ [$\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{enzyme} \cdot \text{min}^{-1}$] として計算に用いる。

2.2.3 結果と考察

2.2.3.1 分配平衡実験

Fig.2-7 に平衡分配実験の結果を示す。横軸は液相中の各糖濃度、縦軸は担体中の各糖濃度を示す。白抜きのプロットは担体量 3.0g、黒抜きのプロットは 4.0g の場合である。液相の平衡濃度と担体中の平衡濃度の間には担体量や糖の初期濃度の違いとは関係なく、ほぼ線形関係が成り立っていることがわかる。また、本システム中に存在する最も分子量の大きい 6 糖と最も小さな 2 糖を用いた実験結果が同一直線上にあることもわかる。分配係数 H は、これらのデータの傾きから最小自乗法により求めることができ、ここでは $H=0.95$ となった。これより、本システムにおける分配係数は、2～6 糖では分子量によらず一定であると考え、この値を計算に用いた。

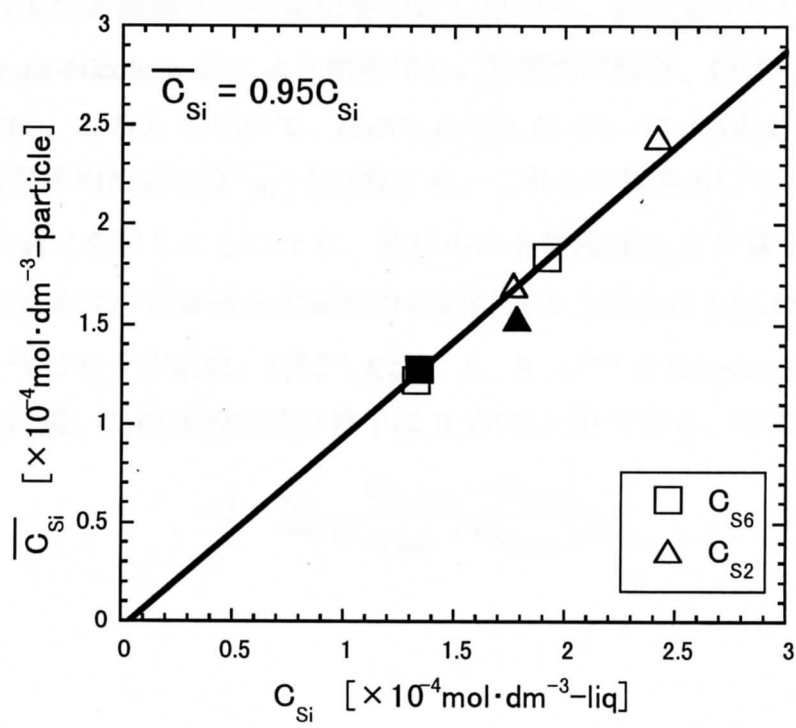


Fig.2-7 Equilibrium concentrations of saccharide in support particle vs. those in liquid phase.

2.2.3.2 速度論モデルの適用

本固定化系では、前述した分配平衡実験により分配係数が求まるため、本モデルの未知定数は V_{\max}^{imm} , K_m^{imm} , A , B , α^{imm} の5つとなる。溶液中の糖濃度のみが実験的に求まるため、均相系と同様に5つの異なる条件下で得られた溶液中の糖濃度の実験結果に対してモデルによるフィッティングを行った。Fig.2-8 に計算手順のフローチャートを示す。計算は、モデル定数および各糖濃度の初期値を設定したのち、無次元化した担体内の物質収支式(2-39)式を Crank-Nicolson 法により離散化し、数値的に解き、担体内の各糖濃度 \bar{Z}_i を計算する^{12),13)}。次に、この \bar{Z}_i を用いて、(2-37), (2-38), (2-43) ~ (2-46)式より、担体内の平均糖濃度 $\langle \bar{Z}_i \rangle$ および平均反応速度 $\langle \bar{\chi}_i \rangle$ を計算する。これらの値を用いて、反応器内の物質収支式である (2-34)式を解くことにより、液相中の各糖濃度 Z_i を計算する。そして、得られた液相中の各糖濃度の計算値と実験値の相対誤差の二乗の和を(2-47)式より求め、それが最小になるようなモデル定数、 V_{\max}^{imm} , K_m^{imm} , A , B , α^{imm} を Simplex 法により推算する。また、数値計算に用いた担体内の差分格子は R 方向に 50 であり、時間刻みは 18 sec である。

$$S = \sum \left[\frac{C_{Si,calc} - C_{Si,exp}}{(C_{Si,calc} + C_{Si,exp})/2} \right]^2 \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-47)$$

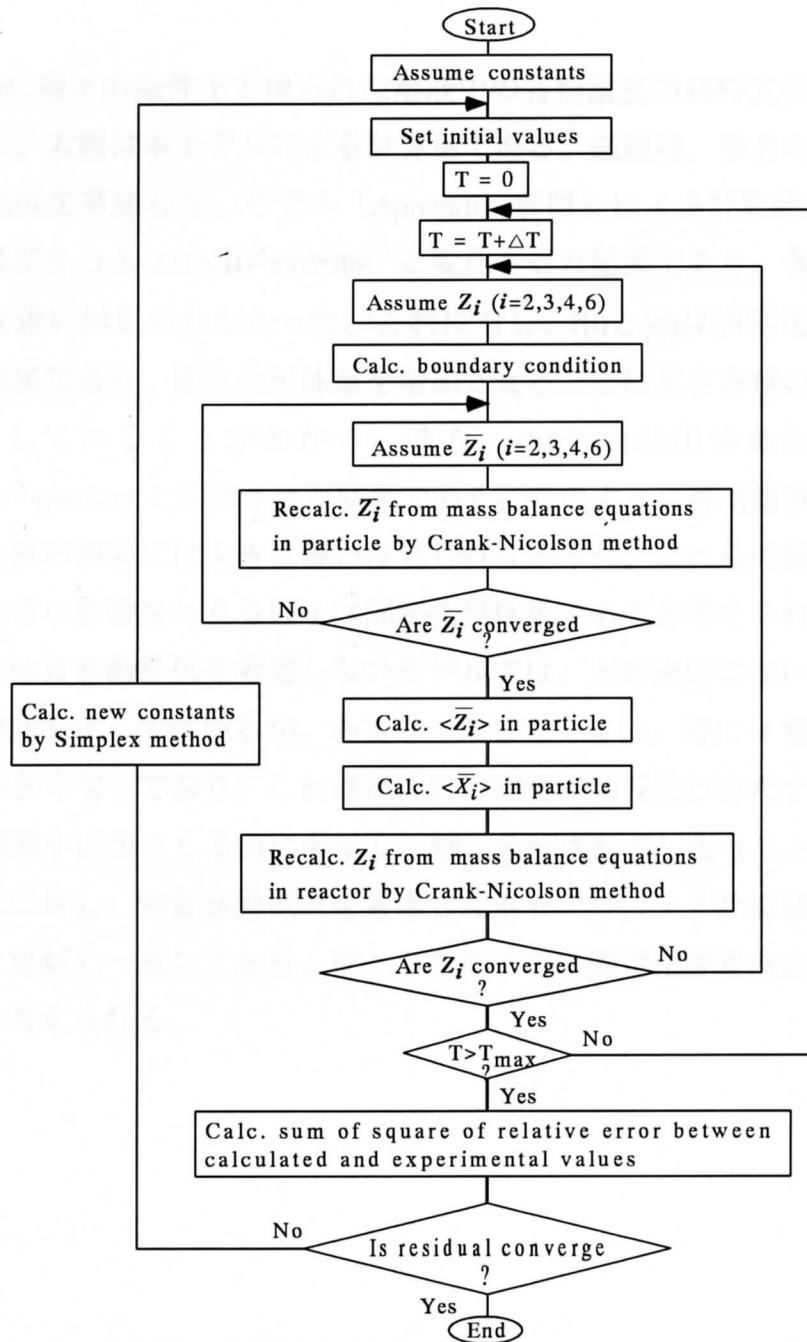


Fig. 2-8 Flowchart for estimation of constants.

2.2.3.3 溶液中の各糖濃度の経時変化

Fig.2-9(a)~(c)に種々の条件下で得られた溶液中の各糖濃度の経時変化を示す。プロットは実験値であり、太線は本モデルによる計算値である。破線は、参考のために行った担体内の物質移動抵抗を考慮しないモデル（Appendix 参照）による計算結果である。(a)~(c)は、初期基質濃度を $1.3\sim 2.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ と変化させた結果であり、各糖の消費や生成の傾向には大きな違いは見られなかった。これに対し、(b)と(d)は固定化担体量を $1.0\sim 1.5 \text{g}$ と変化させた結果であり、固定化担体量を増加させることにより各糖の消費や生成の速度も大きく増加していることがわかる。また、(b)と(e)は担体あたりの酵素濃度を $13.5\sim 9.51 \text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$ と変化させた結果である。このように酵素濃度を減少させても、各糖の消費や生成の傾向には大きな違いは見られなかった。これらの結果から、糖の消費や生成に最も大きな影響を与える因子は固定化担体量であると考えられる。一方、破線で示した担体内の物質移動抵抗を考慮しないモデルでは、どの条件においても計算値は実験値の大まかな傾向を示してはいるが、あまり一致していない。特に4糖の実験値は計算値よりもかなり小さくなっており、これは担体内の物質移動抵抗が存在するため、担体内で生じた4糖が溶液中に出てくる前に素早く2糖に分解されてしまうことが原因であると考えられる。これに対し、物質移動抵抗を考慮した本モデルによる計算値は、どの条件においても実験値と良好に一致しており、種々の条件下での固定化酵素反応を良好に表現することができると考えられる。

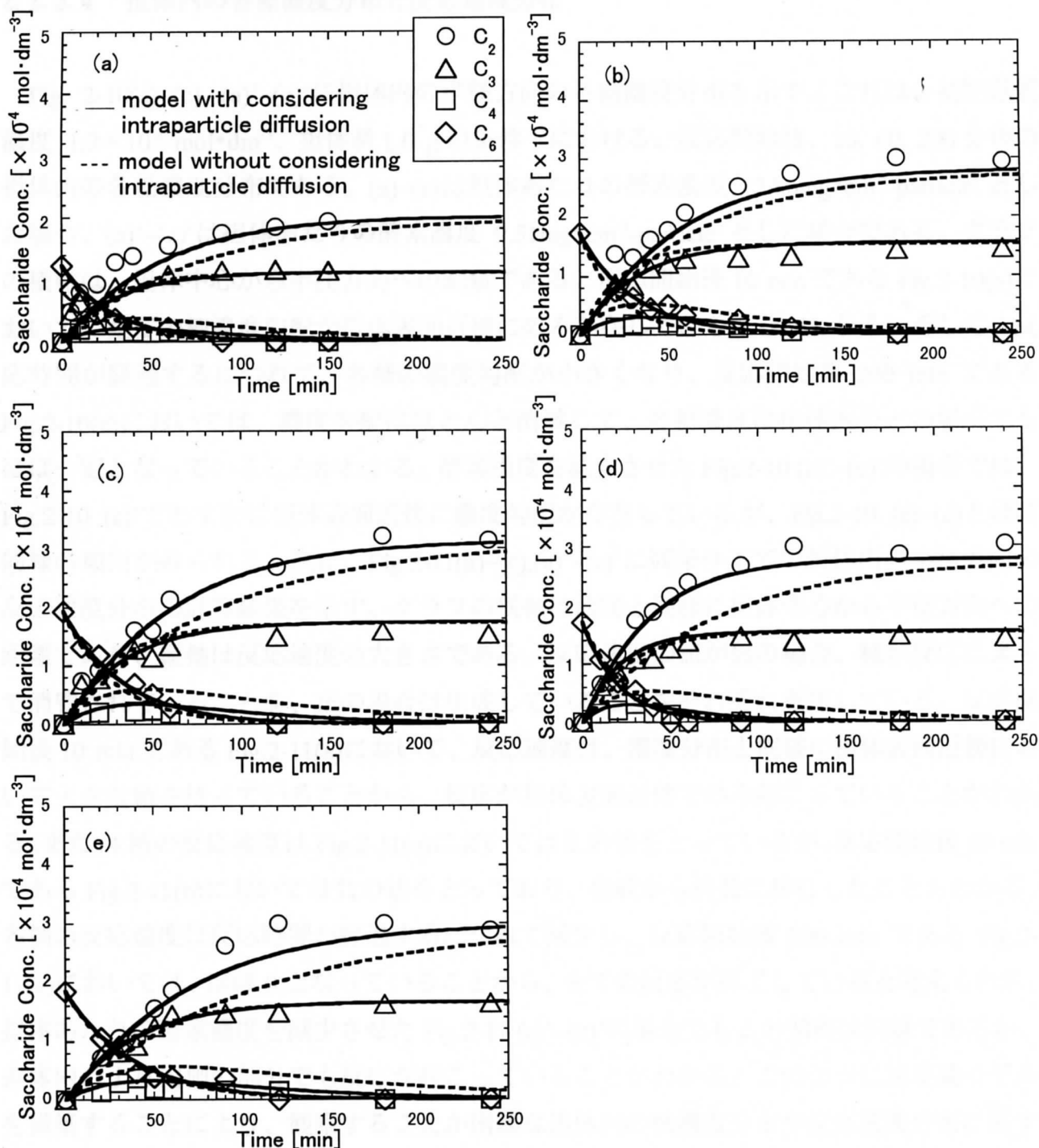


Fig.2-9 Experimental and calculated results in immobilized enzyme system.

- (a) $C_{S_6}(0) = 1.3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (b) $C_{S_6}(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (c) $C_{S_6}(0) = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (d) $C_{S_6}(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $W_p = 1.5 \text{ g}$, $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (e) $C_{S_6}(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $C_E^{imm}(0) = 9.51 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle

2.2.3.4 担体内の各糖濃度分布と反応速度分布

Fig. 2-10(a)~(c), (a)'~(c)'に担体内の半径方向の各糖濃度分布を示す。これは、初期基質濃度 $1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、担体量 1.0 g の条件下における、反応開始後、10, 60, 200 分後の担体内の各糖濃度分布である。(a)~(c)は担体あたりの酵素濃度 $13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$ とした場合、(a)'~(c)'は担体あたりの酵素濃度 $9.51 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$ とした場合である。グラフの横軸は、担体中心から半径方向への距離である。反応開始後 10 min である Fig.2-10(a)において、全ての糖濃度勾配が担体表面近傍にのみ存在していることがわかる。そして、反応時間が経過するにつれて、各糖の濃度勾配が小さくなり、反応開始後 200 min である Fig.2-10(c)においては、濃度勾配はほとんど消滅して、各糖濃度は担体内のどの場所でもほぼ一定となっていることがわかる。酵素濃度を減少させた Fig.2-10 (a)'~(c)'の場合では、Fig.2-10 (c)'でわずかに担体表面近傍に濃度勾配が存在しているが、Fig.2-10 (a)~(c)とほぼ同様の傾向がみられる。次に、Fig.2-11(a)~(c),(a)'~(c)'に同条件下での担体内の半径方向の反応速度分布の計算結果を示す。グラフの横軸は前図と同様に担体中心から半径方向への距離であり、縦軸は反応速度の大きさである。反応速度の値が負の場合、糖が反応によって消費されていることを、正の場合は生成していることをそれぞれ意味している。反応開始後 10 min である Fig.2-11(a)において、反応速度は、濃度分布と同様に担体表面近傍において大きな値を持っていることから、反応が担体表面近傍でのみ起こっていることがわかる。また、4 糖の反応速度は Fig.2-11(a)においては正の値をとっているが、反応開始後 60 min である Fig.2-11(b)においては負の値をとっており、生成から消費に移行したこともわかる。各糖の反応速度は反応時間が経過するにつれて減少し、反応開始後 200 min である Fig.2-11(c)においては、ほぼ 0 となっていることから、全ての反応が終了していると考えられる。担体あたりの酵素濃度を減少させた Fig.2-11 (a)'~(c)'の場合でもこの傾向は同様であるが、担体内のより内側の部分でも反応が起こっていることがわかる。このように速度論モデルを構築することにより、観察することが困難な担体内の糖濃度分布や反応速度分布に関する情報を得ることができる。また、これらの情報から、本固定化酵素反応システムでは、担体表面近傍に固定化された酵素のみが、糖の加水分解反応に対して有効に働いていると考えられる。これは、この系での糖の加水分解速度が担体内での糖の拡散速度よりも著しく大きいためであると考えられる。

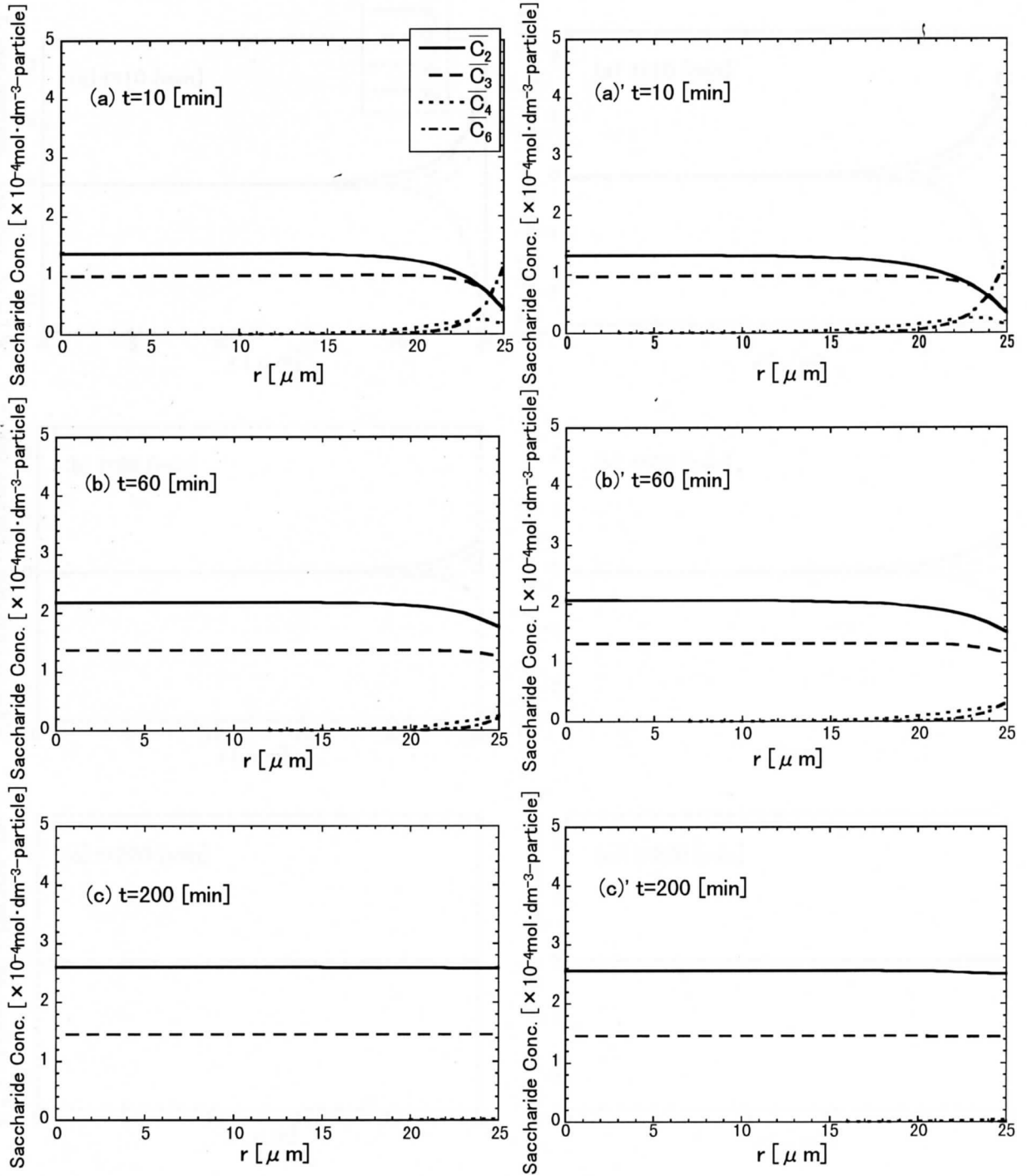


Fig.2-10 Calculated distribution of saccharide concentration in support particle.

$$C_{S_6}(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, W_p = 1.0 \text{ g}$$

(a)~(c) $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$, (a')~(c') $C_E^{imm}(0) = 9.51 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$

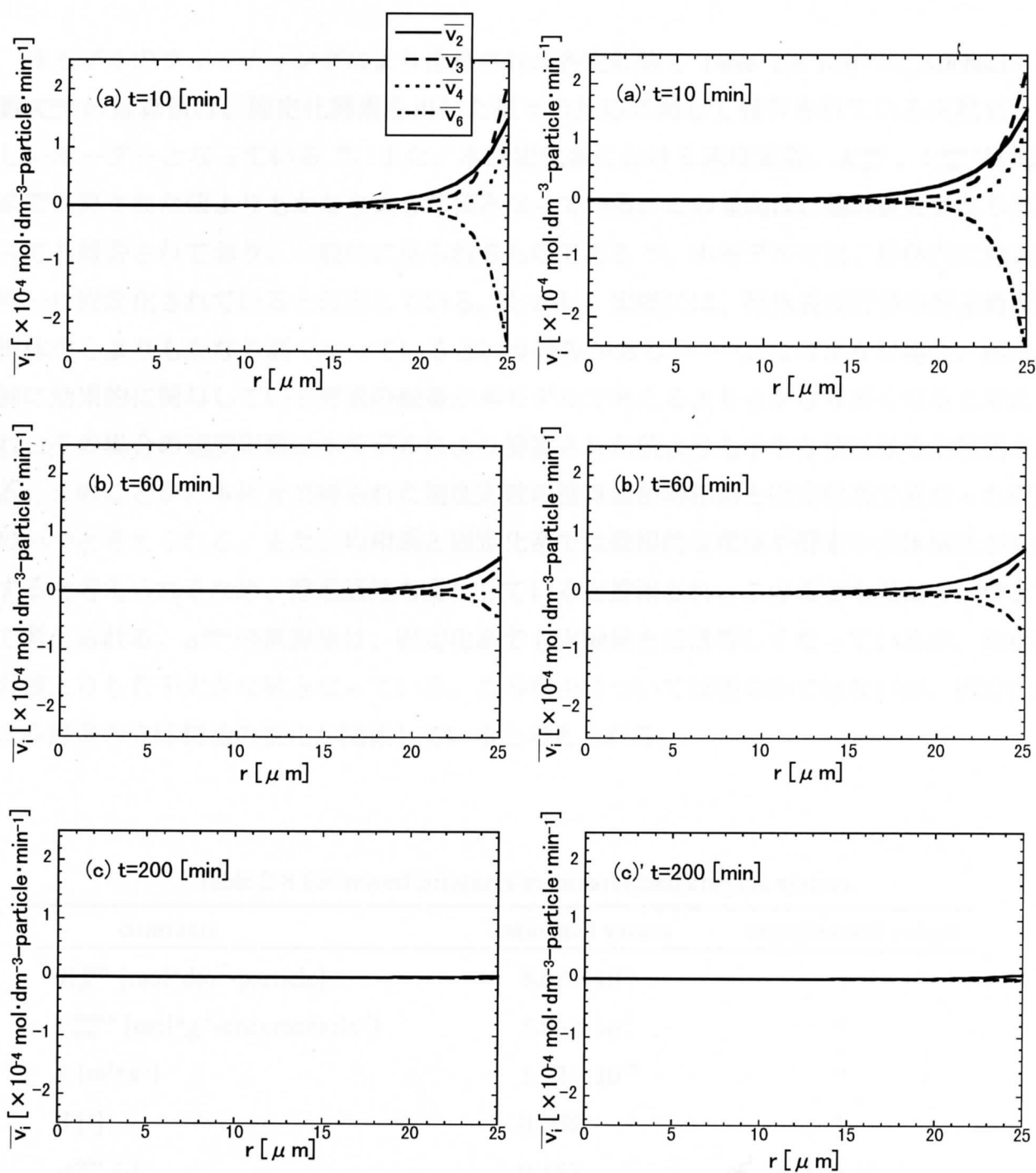


Fig.2-11 Calculated distribution of hydrolysis rate in support particle.

$$C_{s6}(0) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, W_p = 1.0 \text{ g}$$

$$(a) \sim (c) \quad C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}, (a)' \sim (c)' \quad C_E^{imm}(0) = 9.51 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}$$

2.2.3.5 モデル定数の推算値

本モデルのフィッティングにより推算された各定数値を Table 2-8 に示す。Michaelis 定数 K_m^{imm} の推算値は、固定化酵素を用いた種々の反応に関して報告されている文献値と等しいオーダーとなっている⁹⁾。また、本固定化系における速度定数、 K_m^{imm} 、 V_{max}^{imm} は均相系で推算された値よりもかなり大きな値となっている。この傾向は、他の研究者たちによっても報告されており、一般的に見られるものである¹⁴⁾。本モデルでは、担体内に酵素が均一に固定化されていると仮定している。しかし、実際には、担体表面近傍の酵素濃度が担体中心よりもかなり高くなっているという報告がある^{3),15),16)}。このような場合、加水分解に効果的に関与している酵素の総量が本モデルで考えるよりもかなり多くなると考えられ、その場合の速度定数は本モデルにより推算された値よりも小さな値になると推測される。このことが、本研究で得られた速度定数の推算値が均相系と固定化系で異なった理由の一つと考えられる。また、均相系と固定化系では微視的な環境や酵素の立体構造が変化すると考えられるため、酵素活性も変化していると推測され、このことも理由の一つとして考えられる。 α^{imm} の推算値は、固定化系でも実験値とほぼ等しくなっているが、均相系の値よりも若干大きな値となっている。この理由については明らかではないが、固定化による酵素の立体構造の変化が関係していると考えられる。

Table 2-8 Estimated constants in immobilized enzyme system.

constants	estimated values	experimental values
K_m^{imm} [mol•dm ⁻³ -particle]	8.67×10^{-2}	*
V_{max}^{imm} [mol•g ⁻¹ -enzyme•min ⁻¹]	5.86×10^{-2}	*
A [m ² •s ⁻¹]	1.72×10^{-10}	*
B [-]	0.808	*
α^{imm} [-]	0.455	0.41~0.46

*unobtainable

Table2-9 に本モデルによる担体内の有効拡散係数 D_i^{eff} の推算値を示す。参考のために、Nakao らが報告した経験式(2-48)式¹⁷⁾より計算した水溶液中での拡散係数の値も示す。

$$D_i^{eff} = 8.76 \times 10^{-9} (M_{wi})^{-0.48} \quad (i=2,3,4,6) \quad (2-48)$$

固定化系に関する多くの研究において、担体内の基質や生成物の D_i^{eff} の値は水溶液中の D_i^{eff} とほぼ等しいと仮定されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。しかし、本研究でフィッティングにより得られた担体内の D_i^{eff} の値は、水溶液中の値よりも数オーダー小さな値となった。一般的に、この傾向はイオン交換樹脂などの高分子媒体中でよく観察される²¹⁾。本研究で用いた担体粒子は、分配平衡定数 H がほぼ 1 に等しいことから、水で十分に膨潤している多孔性物質であると考えられるが、担体内の拡散は、粒子内の網目構造による立体障害により制限されるため、水溶液中の拡散係数の値よりも小さな値となったと考えられる。

また、Table2-10 にフィッティングによる各定数の推算値の妥当性を検討するために行ったシミュレーション結果を示す。シミュレーションの方法は、前述した均相系の場合と同様である。定数値を推算値の 0.5~2.0 倍まで変化させることで得られた S の値は、最小値 S_{min} よりも少なくとも 6%以上大きい値となっている。従って、本研究で推算されたモデル定数値の信頼性は、均相系と同様に比較的高いものであると考えられる。

Table 2-9 Estimated values of effective diffusivities in support particle and calculated values from empirical equation reported by Kimura and Nakao¹⁷⁾ in aqueous solution.

effective diffusivities [$m^2 \cdot s^{-1}$]	in support particle	in aqueous solution
D_6^{eff}	6.53×10^{-13}	3.19×10^{-10}
D_4^{eff}	8.99×10^{-13}	3.86×10^{-10}
D_3^{eff}	11.3×10^{-13}	4.42×10^{-10}
D_2^{eff}	15.4×10^{-13}	5.32×10^{-10}

Table 2-10 Sensitivity of model constants in immobilized enzyme system. ¹

constants	value	S	deviation ($S - S_{min}$) / S_{min}
K_m^{imm}	4.33×10^{-2}	196.7	8.8%
	8.67×10^{-2}	180.8	minimum
	17.3×10^{-2}	196.0	8.4%
V_{max}^{imm}	2.93×10^{-2}	196.1	8.5%
	5.86×10^{-2}	180.8	minimum
	11.7×10^{-2}	196.8	8.8%
A	0.86×10^{-10}	*	*
	1.72×10^{-10}	180.8	minimum
	3.44×10^{-10}	191.6	6.0%
B	0.404	307.2	69.9%
	0.808	180.8	minimum
	1.62	*	*
α^{imm}	0.228	220.1	21.7%
	0.445	180.8	minimum
	0.911	391.8	116.7%

*calculation impossible

2.2.3.6 反応速度に及ぼす各種操作因子の影響

2.2.2 で構築した固定化酵素システムに関する速度論モデルの妥当性が実験的に示されたため、このモデルによりシミュレーションを行い、加水分解速度に及ぼす各種操作因子の影響を検討する。シミュレーションには、前節の Table 2-8 に示したフィッティングによって推算したモデル定数の値を用いた。シミュレーションを行う条件を Table 2-11 に示す。case1 から case3 の各条件は、初期基質濃度、反応系内の総酵素量を一定としている。

Table 2-11 List of operational factors for simulation.

	基質濃度 [mol·dm ⁻³ -liq.]	酵素濃度 [mg·cm ⁻³ -particle]	担体量 [g]	担体粒径 [μm]	総表面積 [m ²]	総酵素量 [mg]
case1	1.7×10 ⁻⁴	13.86	1.0	50	0.12	12.08
case2	1.7×10 ⁻⁴	6.93	2.0	50	0.24	12.08
case3	1.7×10 ⁻⁴	13.86	1.0	25	0.24	12.08

Fig.2-12(a) ~ (c)に液相中の各糖濃度の経時変化に関するシミュレーション結果を、Fig.2-13(a-1)~(a-3), (b-1)~(b-3), (c-1)~(c-3)に担体内の半径方向の糖濃度分布に関するシミュレーション結果を示す。Fig. 2-12(a)~(c)で 6 糖の消費に注目した場合、(a)すなわち case1 では 150min, (b) すなわち case2 では 100min, (c)すなわち case3 では 70min 程度でほとんど完了していることがわかる。2,3 糖の生成に関しても、(a)では 250min でもまだ若干生成傾向が見られるが、(b)では 250min で、(c)では 200min 程度で、ほぼ生成が完了していることがわかる。case1 と比較して総表面積が 2 倍である case2 では、各糖濃度の変化が著しい。このことから、担体の総表面積が大きいほど反応速度が大きいと考えられる。これは、反応が担体近傍でのみ起こっているため、総表面積が大きいほど関与する酵素量が多くなり反応速度が大きくなると考えられる。case2 と比較して担体の総表面積が等しく担体粒径が 1/2 倍である case3 では、各糖濃度が case2 よりもさらに速く変化している。この理由を Fig.2-13(a)~(c)に示す担体内の各糖濃度分布で説明する。(b)すなわち case2 では担体中の糖濃度分布が反応開始 10 分後では担体表面近傍にのみ勾配が存在しているのに対し、(c)すなわち case3 では担体中心付近まで濃度勾配が存在していることがわかる。担体粒径を小さくした場合、(2-34)式で定義される Thiele 数が担体半径の 2 乗に比例するため小さくなり、より担体内部にまで各糖が拡散し、担体内部に固定化された酵素も反応に関与する

ことができる。このため、反応系内の総酵素量が等しくても粒径を小さくした場合に反応速度が大きくなったと考えられる。

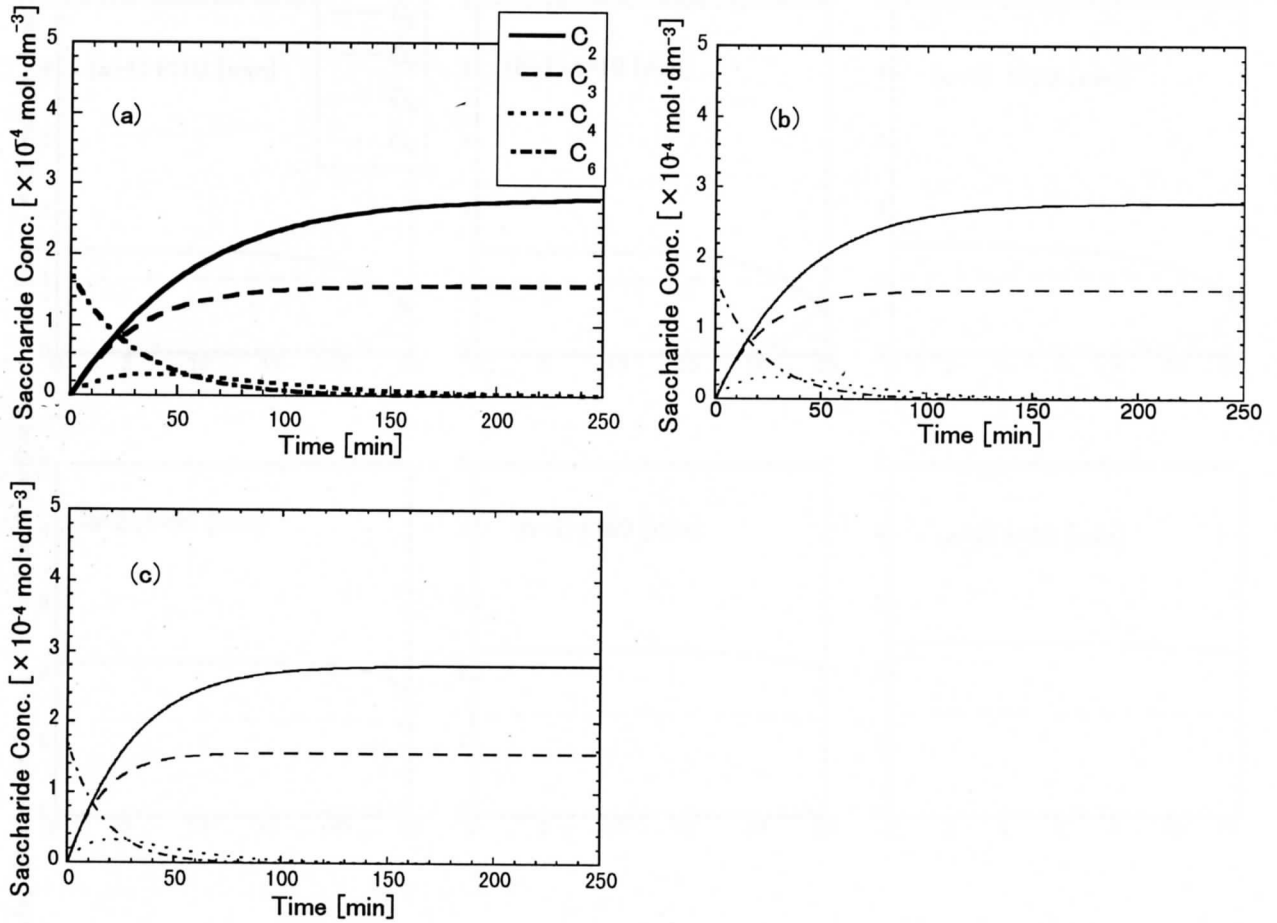


Fig.2-12 Calculated results in immobilized enzyme system.
 (a)case1 ; $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $D_p = 50 \text{ } \mu\text{m}$.
 (b)case2 ; $C_E^{imm}(0) = 6.93 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$, $W_p = 2.0 \text{ g}$, $D_p = 50 \text{ } \mu\text{m}$.
 (c)case3 ; $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{-particle}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $D_p = 25 \text{ } \mu\text{m}$.

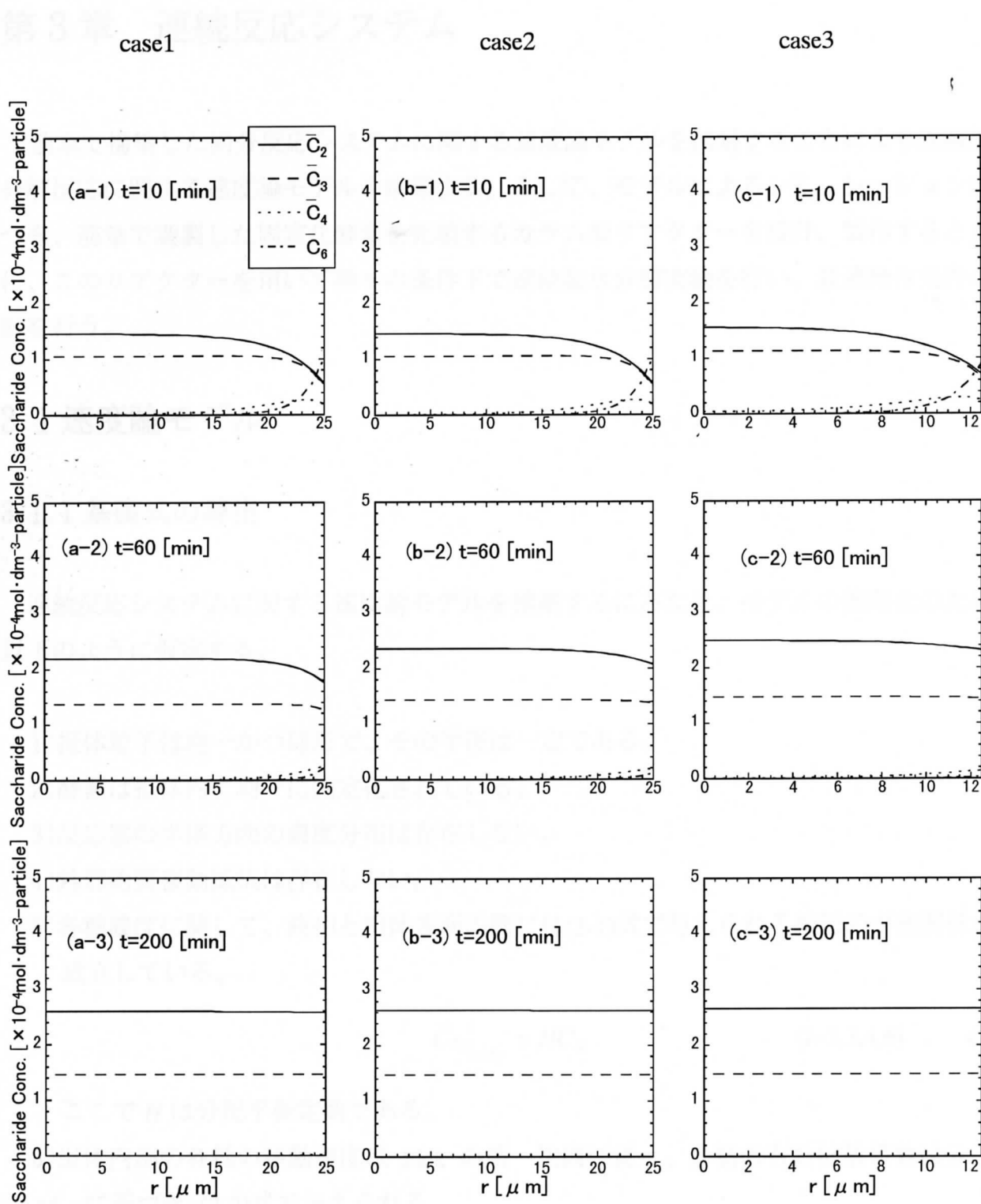


Fig.2-13 Calculated distribution of saccharide concentration in support particle.

(a) case1 ; $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $D_p = 50 \text{ } \mu\text{m}$.

(b) case2 ; $C_E^{imm}(0) = 6.93 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}$, $W_p = 2.0 \text{ g}$, $D_p = 50 \text{ } \mu\text{m}$.

(c) case3 ; $C_E^{imm}(0) = 13.86 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}$, $W_p = 1.0 \text{ g}$, $D_p = 25 \text{ } \mu\text{m}$.

第3章 連続反応システム

前章で構築した回分反応システムに関する速度論モデルを拡張することにより連続加水分解反応に関する速度論モデルを構築する。そして、モデルによるシミュレーションに基づき、前章で調製した固定化酵素を充填するカラム型リアクターを設計、製作するとともに、このリアクターを用いて種々の条件下で連続加水分解実験を行い、最適操作条件の検討を行う。

3.1 速度論モデル

3.1.1 基礎式の導出

連続反応システムに関する速度論モデルを構築するにあたり、モデルの簡略化のため、以下のように仮定する。

- 1)担体粒子は均一かつ球形で、その半径は一定である。
- 2)酵素は担体内に均一に固定化されている。
- 3)反応器の半径方向の濃度分布は存在しない。
- 4)外部物質移動抵抗は存在しない。
- 5)各糖濃度に関して、液相と担体表面の間には(3-1)式で与えられる線形の平衡関係が成立している。

$$\bar{C}_{Si} \Big|_{r=R_p} = H C_{Si} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-1)$$

ここで H は分配平衡定数である。

- 6)担体内部の各糖の移動速度は Fick の第一法則に従う。各糖の有効拡散係数は分子量 M_{wi} に基づき (3-2)式で与えられる。

$$D_i^{eff} = A \times (M_{wi})^{-B} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-2)$$

反応器内の各糖の物質収支は、(3-3)式で与えられる。

$$\frac{\partial C_{Si}}{\partial t} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{\partial \langle \bar{C}_{Si} \rangle}{\partial t} = E \frac{\partial^2 C_{Si}}{\partial x^2} - u \frac{\partial C_{Si}}{\partial x} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \langle \bar{v}_i \rangle \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-3)$$

ここで、左辺は非定常項であり、右辺の各項はそれぞれ分散、対流および反応による消失・生成を表す。 E [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]は反応器内における分散係数であり、(3-4)式に示される経験式²²⁾より求められる。

$$E = 2uR_p \quad (3-4)$$

ここで R_p [m]は担体粒子半径である。 u [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]は線流速である。

初期条件は(3-5),(3-6)式で与えられる。境界条件は入口側をステップ入力として(3-7)式、出口側を閉鎖系の境界条件に基づき(3-8)式で与えられる。

$$\text{i.c. } t=0 \quad 0 < x \leq L; C_{Si} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-5)$$

$$x=0; C_{Si} = \begin{cases} C_{S6}(0) & (i=6) \\ 0 & (i=2,3,4) \end{cases} \quad (3-6)$$

$$\text{b.c. } x=0; C_{Si} = \begin{cases} C_{S6}(0) & (i=6) \\ 0 & (i=2,3,4) \end{cases} \quad (3-7)$$

$$x=L; \frac{\partial C_{Si}}{\partial x} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-8)$$

ここで、 L [m]はカラム長さである。

また、担体内の平均糖濃度 $\langle C_{Si} \rangle$ および平均反応速度 $\langle v_i \rangle$ は回分反応と同様に、(3-9),(3-10)式で定義される。

$$\langle C_{Si} \rangle = \frac{\int_0^{R_p} \overline{C_{Si}} 4\pi r^2 dr}{\frac{4}{3}\pi R_p^3} = \frac{3}{R_p^3} \int_0^{R_p} \overline{C_{Si}} r^2 dr \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-9)$$

$$\langle v_i \rangle = \frac{\int_0^{R_p} \overline{v_i} 4\pi r^2 dr}{\frac{4}{3}\pi R_p^3} = \frac{3}{R_p^3} \int_0^{R_p} \overline{v_i} r^2 dr \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-10)$$

一方、各糖の担体内における反応速度 $\overline{v_i}$ は、2.2.2 と同様に均相系の速度論モデルである(2-7)~(2-10)に基づき、担体体積基準の最大反応速度 V_{\max}^{imm} [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{particle} \cdot \text{min}^{-1}$]、担体体積基準の Michaelis 定数 K_m^{imm} [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{particle}$]および担体内の各糖濃度 $\overline{C_{Si}}$ [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{particle}$]を用いて(3-11)~(3-14)式のように表わされる。

$$\overline{v_6} = \frac{-3V_{\max}^{imm} \overline{C_{S6}}}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S6}} + \overline{C_{S4}}} \quad (3-11)$$

$$\overline{v_4} = \frac{V_{\max}^{imm} [3(1 - \alpha^{imm}) \overline{C_{S6}} - \overline{C_{S4}}]}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S6}} + \overline{C_{S4}}} \quad (3-12)$$

$$\overline{v_3} = \frac{6V_{\max}^{imm} \alpha^{imm} \overline{C_{S_6}}}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S_6}} + \overline{C_{S_4}}} \quad (3-13)$$

$$\overline{v_2} = \frac{V_{\max}^{imm} [3(1 - \alpha^{imm}) \overline{C_{S_6}} + 2\overline{C_{S_4}}]}{K_m^{imm} + 3\overline{C_{S_6}} + \overline{C_{S_4}}} \quad (3-14)$$

担体内の各糖の物質収支は、回分システムと同様に仮定 6)より(3-15)式で表される。

$$\frac{\partial \overline{C_{S_i}}}{\partial t} = D_i^{eff} \left(\frac{2}{r} \frac{\partial \overline{C_{S_i}}}{\partial r} + \frac{\partial^2 \overline{C_{S_i}}}{\partial r^2} \right) + \overline{v_i} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-15)$$

ここで、初期条件は(3-16)式、境界条件は仮定 4), 5)より(3-17), (3-18)式で与えられる。

$$\text{i.c.} \quad t=0 \quad 0 \leq r \leq R_p; \quad \overline{C_{S_i}}(0) = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-16)$$

$$\text{b.c.} \quad r=0 \quad ; \quad \frac{\partial \overline{C_{S_i}}}{\partial r} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-17)$$

$$r=R_p; \quad \overline{C_{S_i}} = HC_{S_i} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-18)$$

3.1.2 無次元化

以下の無次元数を定義する。

$$Z_i = \frac{C_{S_i}}{C_{S_6}(0)} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-19)$$

$$\overline{Z_i} = \frac{\overline{C_{S_i}}}{C_{S_6}(0)} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-20)$$

$$X = \frac{x}{L} \quad (3-21)$$

$$T = \frac{D_6^{eff}}{R_p^2} t \quad (3-22)$$

$$A_L = \frac{R_p}{L} \quad (3-23)$$

$$Pe = \frac{uR_p}{D_6^{eff}} \quad (3-24)$$

$$\kappa = \frac{K_m^{imm}}{C_{S_6}(0)} \quad (3-25)$$

$$\overline{\chi_i} = \frac{\overline{v_i}}{V_{\max}^{imm}} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-26)$$

$$R = \frac{r}{R_P} \quad (3-27)$$

$$\phi = \frac{R_P^2 V_{\max}^{imm}}{D_6^{eff} C_{s_6}(0)} \quad (3-28)$$

$$\overline{D} = \frac{E}{D_6^{eff}} \quad (3-29)$$

ここで、 $C_{s_6}(0)$ は6糖の初期濃度、 D_6^{eff} は6糖の有効拡散係数である。

これらの変数を用いることにより、反応器内の物質収支式(3-3)、初期および境界条件(3-5)~(3-8)式は以下のように無次元化される。

$$\frac{\partial Z_i}{\partial T} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{\partial \langle \overline{Z_i} \rangle}{\partial T} = A^2 \overline{D} \frac{\partial^2 Z_i}{\partial X^2} - A P e \frac{\partial Z_i}{\partial X} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \phi \langle \overline{\chi_i} \rangle \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-30)$$

$$\text{i.c.} \quad T=0 \quad 0 < X \leq 1; Z_i = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-31)$$

$$X=0; Z_i = \begin{cases} 1(i=6) \\ 0(i=2,3,4) \end{cases} \quad (3-32)$$

$$\text{b.c.} \quad X=0; Z_i = \begin{cases} 1(i=6) \\ 0(i=2,3,4) \end{cases} \quad (3-33)$$

$$X=1; \frac{\partial Z_i}{\partial X} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-34)$$

担体内の平均糖濃度(3-9)式および平均反応速度(3-10)式は以下のように無次元化される。

$$\langle \overline{Z_i} \rangle = 3 \int_0^1 \overline{Z_i} R^2 dR \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-35)$$

$$\langle \overline{\chi_i} \rangle = 3 \int_0^1 \overline{\chi_i} R^2 dR \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-36)$$

また、担体内の物質収支式(3-15)は以下のように無次元化される。

$$\frac{\partial \overline{Z_i}}{\partial T} = \frac{D_i^{eff}}{D_6^{eff}} \left(\frac{2}{R} \frac{\partial \overline{Z_i}}{\partial R} + \frac{\partial^2 \overline{Z_i}}{\partial R^2} \right) + \phi \overline{\chi_i} \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-37)$$

初期条件および境界条件(3-16)~(3-18)式は以下のように無次元化される。

$$\text{i.c.} \quad T=0, 0 \leq R \leq 1; \overline{Z_i}(0) = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-38)$$

3.1.3 計算方法

$$\text{b.c.} \quad R=0 \quad ; \quad \frac{\partial \bar{Z}_i}{\partial R} = 0 \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-39)$$

$$R=1 \quad ; \quad \bar{Z}_i = HZ_i \quad (i=2,3,4,6) \quad (3-40)$$

各糖の反応速度式(3-11)~(3-14)は以下のように無次元化される。

$$\bar{\chi}_6 = \frac{-3\bar{Z}_6}{\bar{Z}_4 + 3\bar{Z}_6 + \kappa} \quad (3-41)$$

$$\bar{\chi}_4 = \frac{3(1 - \alpha^{imm})\bar{Z}_6 - \bar{Z}_4}{\bar{Z}_4 + 3\bar{Z}_6 + \kappa} \quad (3-42)$$

$$\bar{\chi}_3 = \frac{6\alpha^{imm}\bar{Z}_6}{\bar{Z}_4 + 3\bar{Z}_6 + \kappa} \quad (3-43)$$

$$\bar{\chi}_2 = \frac{3(1 - \alpha^{imm})\bar{Z}_6 + 2\bar{Z}_4}{\bar{Z}_4 + 3\bar{Z}_6 + \kappa} \quad (3-44)$$

3.1.3 計算方法

計算に用いたモデル定数値を Table 3-3 に示す。これらの値は 2.2.3 で述べた回分反応システムでのフィッティングにより推算されたものである。

Table 3-3 List of constants for numerical calculation.

Constants	Value
K_m^{imm} [mol•dm ⁻³ -particle]	8.67×10^{-2}
V_{max}^{imm} [mol•g ⁻¹ -enzyme•min ⁻¹]	5.86×10^{-2}
A [m ² •s ⁻¹]	1.72×10^{-10}
B [-]	0.808
α^{imm} [-]	0.455

計算手順のフローチャートを Fig.3-1 に示す。計算は、モデル定数および各糖濃度の初期値を設定したのち、無次元化した担体内の物質収支式(3-37)を Crank-Nicolson 法により離散化し、数値的に解き、担体内の各糖濃度 \bar{Z}_i を計算する。次に、この \bar{Z}_i を用いて、(3-35), (3-36), (3-41) ~ (3-44)式より、担体内の平均糖濃度 $\langle \bar{Z}_i \rangle$ 、および平均反応速度 $\langle \chi_i \rangle$ を計算する。これらの値を用いて、反応器内の物質収支式である(3-30)式を Crank-Nicolson 法により離散化して数値的に解くことにより、液相中の各糖濃度 Z_i を計算する^{12),13)}。計算に用いた差分格子数は担体内は R 方向に 50、 x 方向に 1000、時間刻みは 7.2 sec とした。連続反応システムでは、定常解のみを求めればよいが、本モデルでは、計算を安定に進めるために(3-30)式による非定常計算を行い、漸近定常解を求める手法を用いている。

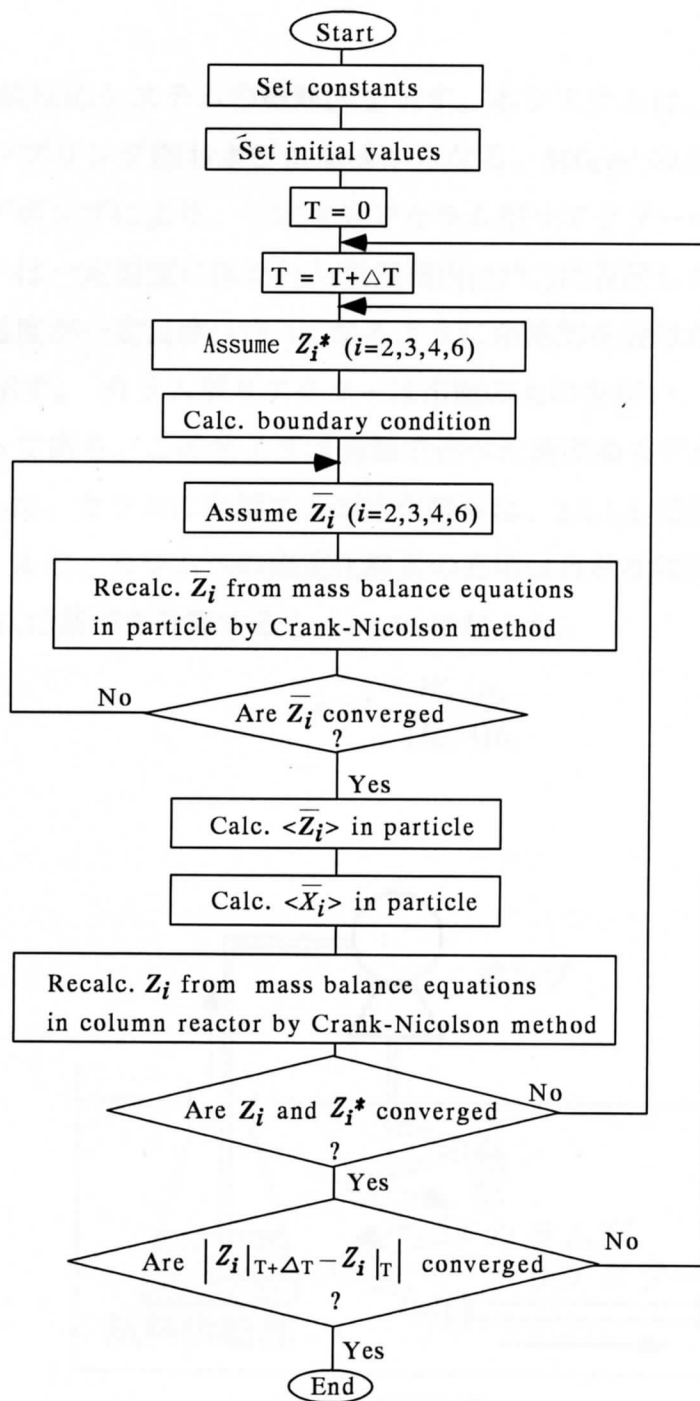


Fig. 3-1 Flowchart for numerical calculation.

3.2 実験

3.2.1 実験装置

Fig.3-2 に連続反応システムの概略図を示す。本システムは、試料供給部、カラム型リアクター、サンプリング部および恒温槽からなる。500cm³の三角フラスコ中の基質溶液はチュービングポンプにより、一定流量でカラム型リアクターへ供給した。フラスコ、およびリアクターは一定温度に保たれた恒温槽内(37℃)に設置した。リアクターに供給される基質溶液の温度が一定温度(37℃)になるように予熱部を設けた。用いた実験装置の仕様を Table 3-4 に示す。カラム型リアクターは市販のものを、サイズは内径(L_d) ; 5mm、長さ(L_e) ; 10cm である。このサイズは前節で述べた速度論モデルを用いたシミュレーションにより決定した。カラムに充填する固定化酵素は、2.2.1.1 で述べた方法で同様に作成したものである。また、カラムへの固定化酵素の充填は自然沈降により行った。この結果、空隙率を(3-45)式に基づき計算すると $\varepsilon = 0.40$ になった。

$$\varepsilon = 1 - \frac{W_p / \rho_p}{(L_d^2 / 4) L_e} \quad (3-45)$$

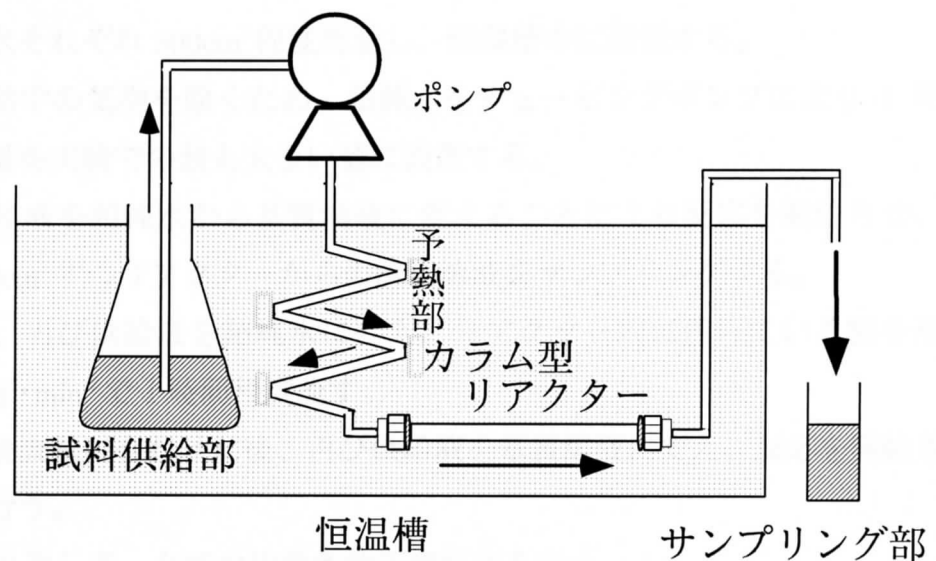


Fig. 3-2 Schematic illustration of column reactor system.

Table 3-4 Specification of column and tube pump.

カラム	: 柴田科学(株)
高圧ガラスカラム GC 型 (内径: 5mm、長さ: 10cm、)	
チュービングポンプ	: EYELA(株) MICRO TUBE PUMP MP-3

3.2.2 連続加水分解実験

前述した装置を用いて、6 糖の連続加水分解実験を行った。反応は、供給液の初期基質濃度および担体あたりの酵素濃度を変化させ、各々の条件下で流量を $1.0\sim9.2\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ まで変化させて行った。また、活性の変化についても検討するため、全ての供給液流量条件での実験が終了した後、1 回目と同じ固定化酵素を充填したカラムを用いて、同条件下で 2 回目の実験を繰り返し行った。反応条件を Table 3-5 に示す。また、実験手順を以下に示す。

- 1) 所定量の固定化酵素をカラム型リアクターに充填するとともに、十分に脱気した基質溶液および超純水それぞれ 300cm^3 程度用意し、恒温槽中に設置する。
- 2) リアクターや流路中の気泡を除くため、超純水をチュービングポンプにより 1 時間程度流した後、流量を実験での最も大きい値に設置する。
- 3) ポンプによる供給液を超純水から基質溶液に変えることにより反応を開始させ、所定の時間間隔で 3.0cm^3 ずつリアクターからの流出溶液をサンプリングする。
- 4) 所定時間経過後、再び供給液を超純水に変え、リアクター内に残っている糖を洗い流すため流量 $3.0\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ で 1 時間程度流す。
- 5) ポンプを次の実験流量に合わせた後、再び供給液を基質溶液に変え、反応を開始させ、サンプリングを行う。
- 6) 4), 5) の操作を繰り返して、全ての流量条件下で反応を行う。

採取したサンプルは、回分反応の場合と同様に、微量試料用限外濾過膜を用いて濾過した。ただし、連続反応の場合は、担体からの酵素の漏出によるサンプル中への固定化酵素

の混入がないことが確認されているため、反応停止などの操作は行わなかった。サンプル中の各糖濃度の分析は、HPLC を用いて測定した。分析条件は回分反応系と同様である。また、カラム型リアクターに充填する固定化酵素は、供給液中の初期基質濃度や酵素濃度条件を変えるごとに、新たに調製したものをを用いた。

Table 3-5 Reaction conditions in column reactor system.

初期基質濃度	:	1.0, 2.0, 3.0×10^{-4} [mol•dm ⁻³]
酵素濃度	:	9.5, 13.5 [mg•cm ⁻³ -particle]
供給液流量	:	1.0, 3.0, 5.0, 9.2 [cm ³ •min ⁻¹]
担体量	:	1.16[g]

3.3 結果と考察

3.3.1 リアクターからの流出液中の各糖濃度

Fig.3-3(a)~(d)に、リアクターに基質を供給し始めた時点を 0 とした、各サンプリング時間での流出液中の各糖濃度をプロットで示す。白抜きのプロットは 1 回目の実験結果であり、黒抜きのプロットは 2 回目の実験結果である。供給液の初期基質濃度は $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、酵素濃度を $13.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle とし、供給液流量は $9.2, 5.0, 3.0, 1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ と変化させたものである。どの条件においても、若干のばらつきはあるが、定常状態に達していることがわかる。また、1 回目と 2 回目の結果がほぼ一致していることから、これら 2 回の実験での酵素の活性に低下はなく、本固定化酵素は繰り返しの利用が可能であると考えられる。

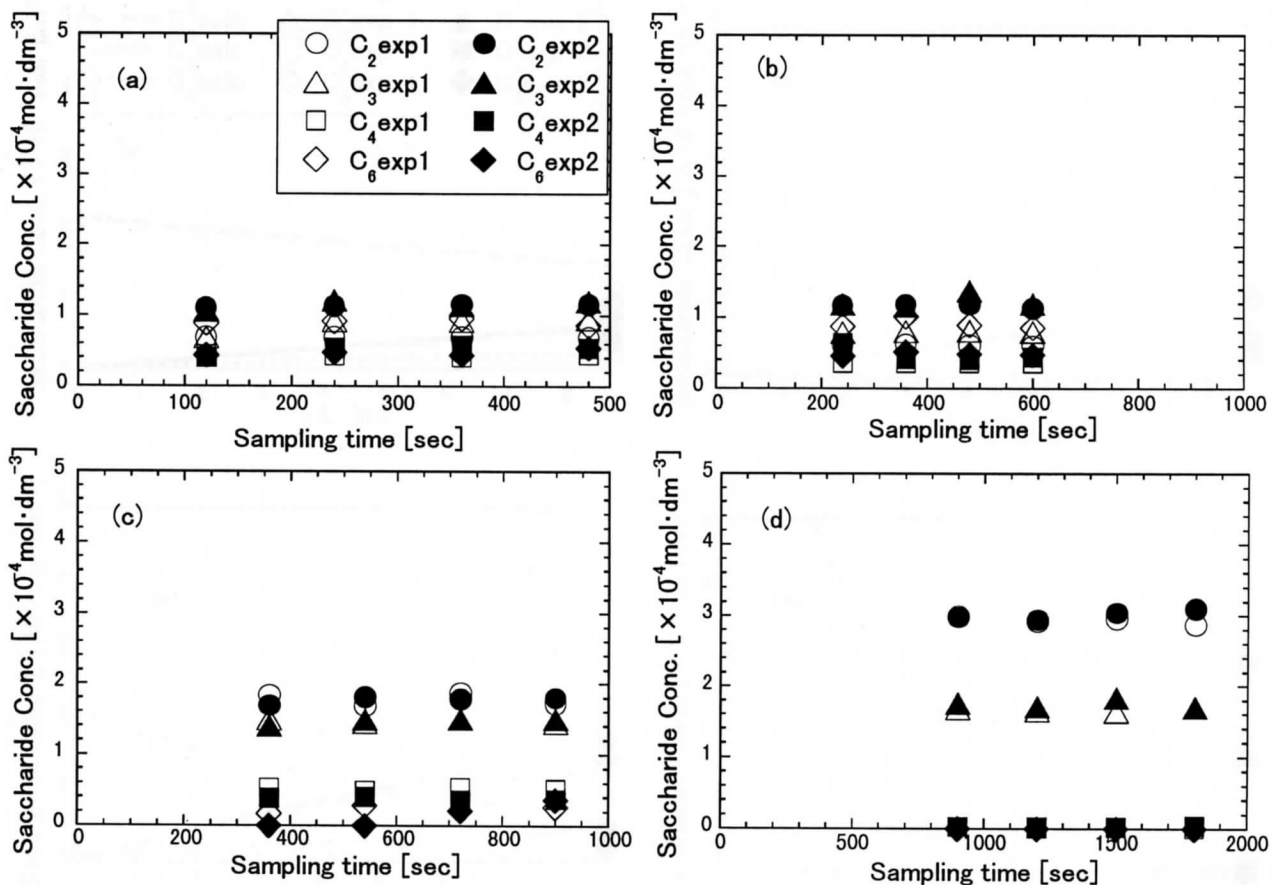


Fig. 3-3 The saccharide concentration in effluent solution at each sampling time.

(a) $Q=9.2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, (b) $Q=5.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, (c) $Q=3.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, (d) $Q=1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Fig.3-4 に同条件下でのリアクター内の管軸方向の各糖濃度分布を示す。グラフの横軸はカラム入口から出口方向への距離である。プロットはリアクター出口における実験値であり、ラインはモデルによるシミュレーション結果である。(a)～(d)は供給液流量を $9.2, 5.0, 3.0, 1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ と種々変化させた場合であり、リアクター内の滞在時間が長くなることに対応する。どの流量条件下においても、リアクター出口でのプロットとラインはほぼ一致しており、3.1 で構築した速度論モデルにより、本連続反応システムを表現することができると考えられる。また、実験ではリアクター出口の溶液中の糖濃度しか測定することができないが、このようなモデルを構築することにより、リアクター内の糖濃度分布に関する情報を得ることができる。これより、供給溶液中の 6 糖がリアクター内を進むにつれて消費され、代わりに 4, 3, 2 糖が生成し、4 糖はさらに分解され 2 糖になるという様子を管の長さ方向に見ることができる。

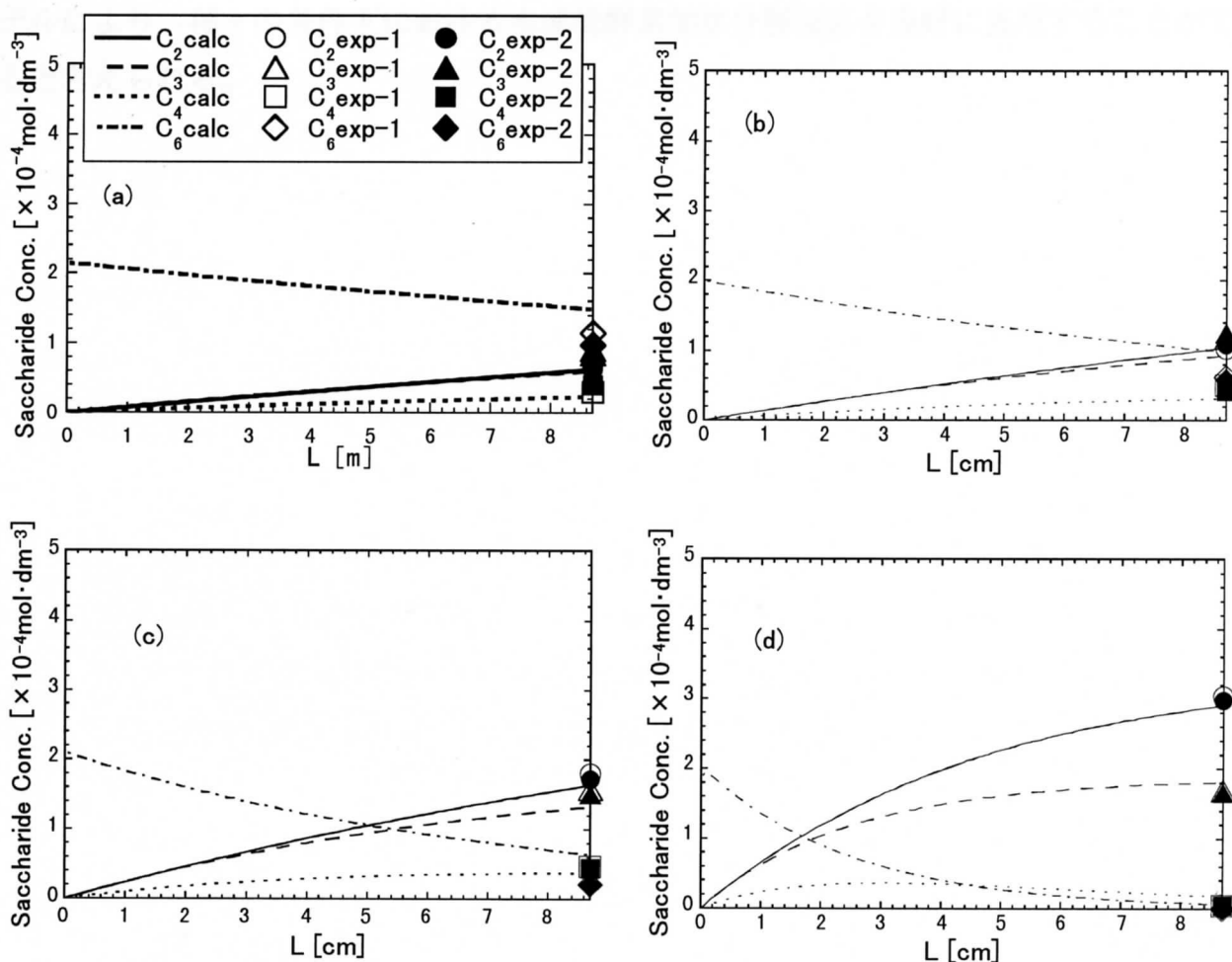


Fig. 3-4 Experimental and calculated of saccharide concentration in effluent solution.
(a) $Q=9.2 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, (b) $Q=5.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, (c) $Q=3.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, (d) $Q=1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Fig.3-5(a)~(d)に初期基質濃度および担体あたりの酵素濃度を変化させた場合の試料溶液のリアクター内滞在時間と各糖濃度の関係を示す。本リアクターでは、実験条件で示した供給液流量 9.2, 5.0, 3.0, 1.0 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ がそれぞれ滞在時間、4.5, 8.2, 13.7, 41sec にあたる。プロットは実験値であり、ラインは本モデルによる計算値である。どの条件下においても、滞在時間が長くなるにつれて、6 糖の出口濃度は単調に減少しているが、4,3,2 糖の出口濃度はそれぞれ増加しており、4 糖はさらに 2 糖にまで加水分解されていることがわかる。滞在時間 40sec とした場合は、出口溶液中に、6,4 糖はほとんど存在していないことがわかる。(a)~(c)は、供給液基質濃度を 1.0~3.0 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{liq.}$ と変化させた結果である。当然のことながら、供給液中の糖濃度が高いほど、4,6 糖の出口濃度も高くなっている。(b)と(d)は、担体あたりの酵素濃度が 13.5 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}$ と 9.51 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{particle}$ の結果である。この場合も滞在時間の変化による各糖の出口濃度に、大きな違いはなかった。一方、どの条件下においてもシミュレーション結果と実験結果は良好に一致している。これより、本モデルにより、種々の条件下における本連続酵素加水分解反応を良好に表現することができると考えられる。

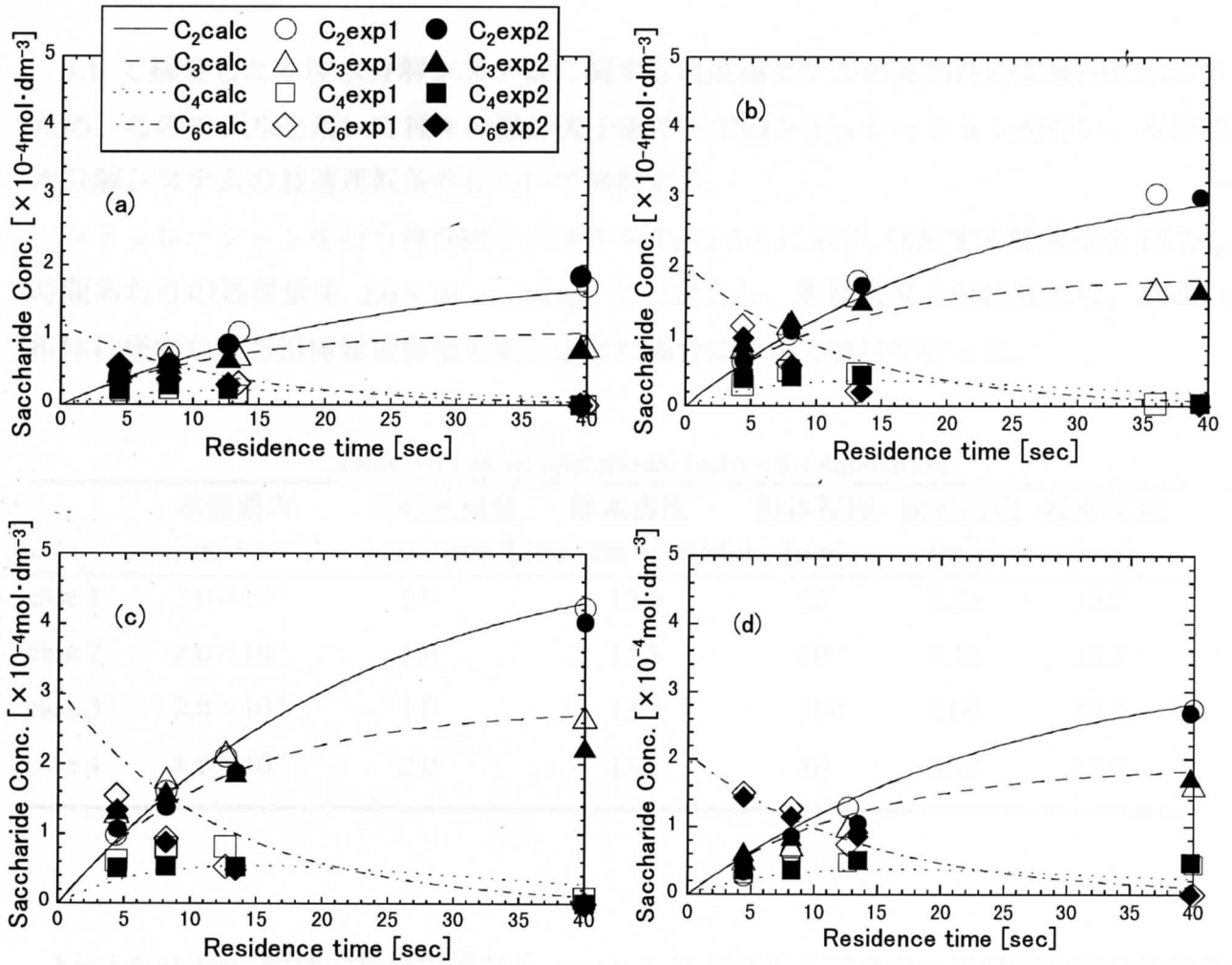


Fig.3-5 Experimental and calculated results in column reactor system.
 (a) $C_{S_6}(0) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ -liquid, $C_E^{imm}(0) = 13.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (b) $C_{S_6}(0) = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ -liquid, $C_E^{imm}(0) = 13.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (c) $C_{S_6}(0) = 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ -liquid, $C_E^{imm}(0) = 13.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle
 (d) $C_{S_6}(0) = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ -liquid, $C_E^{imm}(0) = 9.51 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -particle

3.3.2 反応速度に及ぼす各操作因子の影響

3.1 で構築した本加水分解システムに関する速度論モデルの妥当性が実験的に示されたため、このモデルを用いて種々の操作因子条件下でのシミュレーションを行い、本連続加水分解システムの最適運転条件について検討する。

シミュレーションを行う操作因子の条件を Table 3-6 に示す。使用する酵素量を 15.7mg、時間あたりの処理量を $2.0 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ で一定とし、基質濃度と供給液流量、あるいは担体粒径すなわち担体総表面積を変化させた場合について検討を行った。

Table3-6 List of operational factors for simulation.

	基質濃度 [mol·dm ⁻³]	供給液流量 [cm ³ ·min ⁻¹]	酵素濃度 [mg·cm ⁻³ -particle]	担体粒径 [μm]	総表面積 [m ²]	総酵素量 [mg]
case 1	2.0×10^{-4}	1.0	13.5	25	0.24	15.7
case 2	2.0×10^{-4}	1.0	13.5	50	0.12	15.7
case 3	2.0×10^{-4}	1.0	13.5	100	0.06	15.7
case 4	1.0×10^{-4}	2.0	13.5	50	0.12	15.7

Fig.3-6(a)~(c)に担体の粒径の異なる case1~3 におけるリアクター出口溶液中の各糖濃度のシミュレーション結果を示す。担体の総表面積が大きいほど反応量が大きくなっていることがわかる。これは、2.2.3.6 と同様で、反応が担体表面近傍で起こっているため総表面積が大きいほど関与する酵素量が多くなり反応速度が大きくなるためと考えられる。次に、基質濃度と流量の影響を考察する。case2,4 におけるリアクター出口溶液中の各糖濃度のシミュレーション結果を Fig.3-7(a),(b)に、担体内の半径方向の各糖濃度分布を、(c),(d)に示す。(a)と(b)を比較すると基質濃度が case2 の 1/2 倍である case4 では、各糖濃度の変化が小さくなっている。このとき(c)と(d)を比較すると case4 では小さな濃度勾配が担体表面近傍にのみ存在していることがわかる。これは Thiele 数が基質濃度に反比例するため、基質濃度が小さくなると Thiele 数が大きくなり、担体内部へ拡散せずに担体表面近傍の酵素しか反応に関与せず反応速度が小さくためなると考えられる。

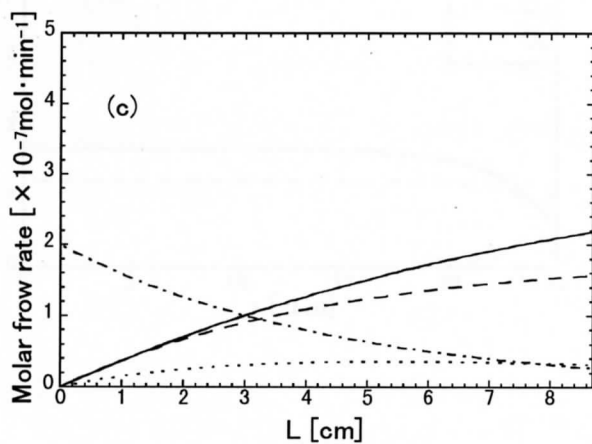
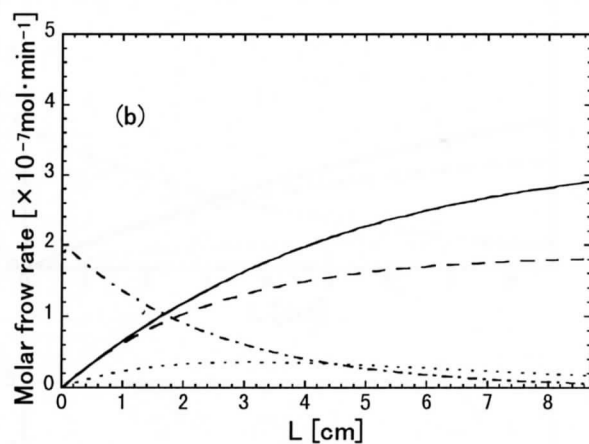
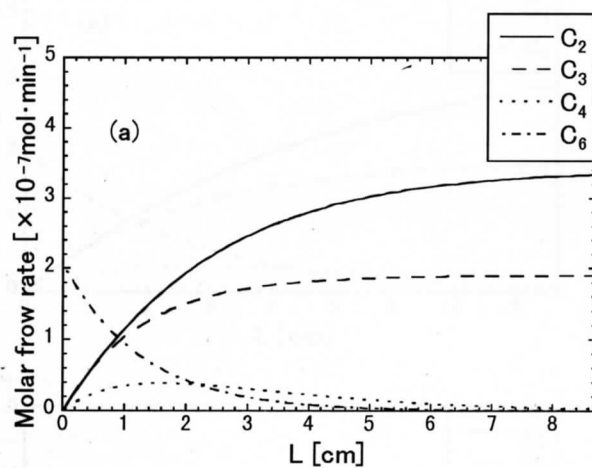


Fig.3-6 Effect of particle diameter of support particle.

(a) case1 ; $C_{s_6}(0) = 2.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p = 25 \mu\text{m}$, $Q = 1.0 \text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

(b) case2 ; $C_{s_6}(0) = 2.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p = 50 \mu\text{m}$, $Q = 1.0 \text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

(c) case3 ; $C_{s_6}(0) = 2.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p = 100 \mu\text{m}$, $Q = 1.0 \text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

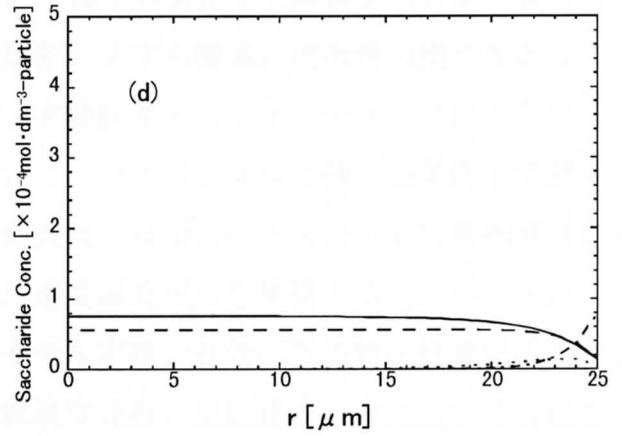
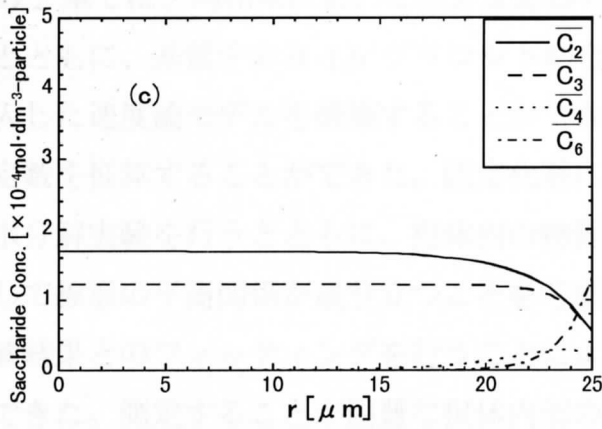
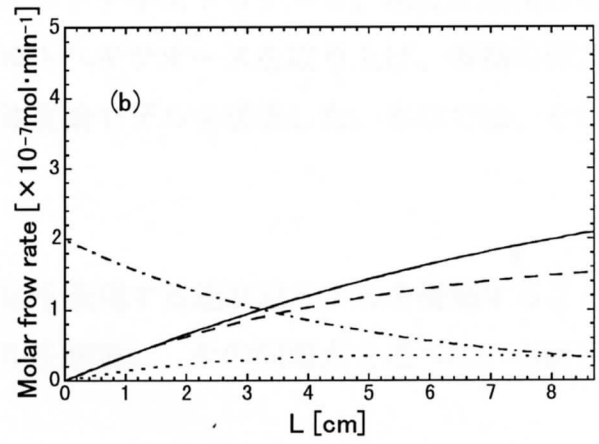
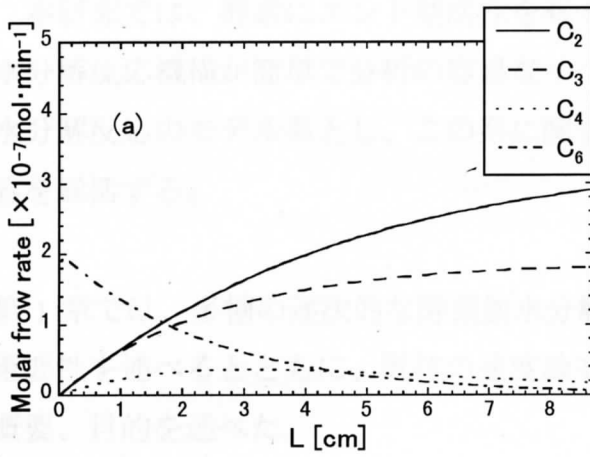


Fig.3-7 Effect of saccharide concentrations and flow rate.

(a) case2 ; $C_{s_6}(0)=2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p=50 \mu\text{m}$, $Q=1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

(b) case4 ; $C_{s_6}(0)=1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p=50 \mu\text{m}$, $Q=2.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

(c) case2 ; $C_{s_6}(0)=2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p=50 \mu\text{m}$, $Q=1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

(d) case4 ; $C_{s_6}(0)=1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $D_p=50 \mu\text{m}$, $Q=2.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

第4章 総括

本研究では、酵素にエンド型活性を有するエンドデキストラナーゼ、基質に逐次的な加水分解反応機構が簡単で分析の容易なイソマルトヘキサオースを取り上げ、多糖の酵素加水分解反応のモデル系とし、この系に関する速度論モデルを構築した。本章では、その内容を総括する。

第1章では、多糖の逐次的な酵素加水分解反応を表現する速度論モデルを構築することの重要性を述べるとともに、既往の速度論モデルを解説し、その問題点を述べた。本研究の概要、目的を述べた。

第2章では、均相系において回分反応器を用いて種々の条件下で酵素加水分解実験を行うとともに、基質中の α -1,6 グリコシド結合の切断に関する酵素の選択性の概念を新規に導入した速度論モデルを構築することができた。実験結果とのフィッティングによりモデル定数を推算することができた。固定化系において、均相系と同様に種々の条件下で酵素加水分解実験を行うとともに、担体内の物質移動抵抗、液相と担体表面の間に各糖濃度に関して線形の平衡関係が成り立つことを考慮した速度論モデルを構築することができた。実験結果とのフィッティングを行うことによりモデル定数、有効拡散係数を推算することができた。測定することが困難な担体内部の各糖濃度分布、反応速度分布に関する情報を得ることができた。

第3章では、回分固定化酵素反応系に関する速度論モデルを拡張することにより、連続酵素加水分解システムに関する速度論モデルを構築し、このモデルに基づき、固定化酵素を充填したカラム型リアクターを設計・製作した。構築したモデルによるシミュレーション結果は、種々の条件下での連続加水分解実験の結果と良好に一致し、本モデルの妥当性が示された。その結果、連続酵素加水分解システムに関して、速度論モデルによるが可能になり、各種操作因子についてシミュレーションにより検討することができた。

最後に今後の展望について述べる。本研究では、多糖の逐次的な加水分解反応を表現する速度論モデルを構築するために、モデル系として基質に6糖を用いた。今後は、より重合度の高いオリゴ糖、さらに高重合度の多糖を基質とした反応系を表現する速度論モデルを構築することが望まれる。

Nomenclature

A	regression coefficient	$[m^2 \cdot s^{-1}]$
A_L	nondimensional number defined in eq.(3-23)	$[-]$
B	regression coefficient	$[-]$
$C_E(0)$	initial enzyme concentration in solution	$[mg \cdot dm^{-3} \cdot liq.]$
$C_E^{imm}(0)$	initial enzyme concentration in support particle	$[mg \cdot dm^{-3} \cdot particle]$
C_{ESi}	concentration of enzyme-substrate complex in solution	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot liq.]$
C_{Si}	concentration of saccharide in solution	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot liq.]$
$\overline{C_{Si}}$	local concentration of saccharide in support particle	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot particle]$
$\langle \overline{C_{Si}} \rangle$	volumetric average concentration of saccharide in support particle	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot particle]$
$C_{Si}(0)$	initial concentration of saccharide in solution	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot liq.]$
\overline{D}	nondimensional number defined in eq.(3-29)	$[-]$
D_i^{eff}	effective diffusivity of saccharide	$[m^2 \cdot s^{-1}]$
D_p	particle diameter	$[m]$
E	dispersion coefficient	$[m^2 \cdot s^{-1}]$
H	partition coefficient of saccharides	$[dm^3 \cdot liq. \cdot dm^{-3} \cdot particle]$
i	counter corresponding to polymerization degree of saccharide	
k_i	rate constant	$[min^{-1}]$
K_m	Michaelis constant in suspended enzyme system	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot liq.]$
K_m^{imm}	Michaelis constant in immobilized enzyme system	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot particle]$
M_w	molecular weight of saccharide	$[g \cdot mol^{-1}]$
L	reactor length	$[m]$
P_e	peclet number	$[-]$
Q	flow rate	$[m^3 \cdot s^{-1}]$
r	radial coordinate	$[m]$
R	nondimensional radial coordinate in support particle	$[-]$
R_p	radius of support particle	$[m]$
S	sum of square of the relative error between calculated value of saccharide concentration and experimental data	$[-]$
t	reaction time	$[min]$
T	nondimensional reaction time	$[-]$
u	linear velocity of liquid	$[m \cdot s^{-1}]$
v_i	hydrolysis rate of saccharide in solution	$[mol \cdot dm^{-3} \cdot liq. \cdot min^{-1}]$

\bar{v}_i	local hydrolysis rate of saccharide in support particle	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{particle} \cdot \text{min}^{-1}]$
$\langle \bar{v}_i \rangle$	volumetric average hydrolysis rate of saccharide in support particle	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{particle} \cdot \text{min}^{-1}]$
V_{\max}	maximum rate constant in suspended enzyme system	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{liq.} \cdot \text{min}^{-1}]$
V_{\max}^{imm}	maximum rate constant in immobilized enzyme system	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{particle} \cdot \text{min}^{-1}]$
W_p	weight of support particle	$[\text{g}]$
X	nondimensional x coordinate	$[-]$
x	coordinate normal to flow direction	$[-]$
Z_i	nondimensional concentration of saccharide in solution	$[-]$
\bar{Z}_i	nondimensional local concentration of saccharide in support particle	$[-]$
α	selectivity coefficient in suspended enzyme system	$[-]$
α^{imm}	selectivity coefficient in immobilized enzyme system	$[-]$
$\bar{\chi}_i$	nondimensional local reaction rate in support particle	$[-]$
κ	nondimensional number defined in eq.(2-31)	$[-]$
ε	reactor voidage	$[-]$
ϕ	Thiele module	$[-]$

引用文献

- 1) Ichita,J., Yamaguchi,S., Kushibiki,M., Ono,H., Hanamatsu,K., Matsue,H., Okuno,T., Miyairi,K., Kazehare,K., *Shokuhinkogyo*, **39**, 60-66(1996)
- 2) 海野肇, 生物化学工学
- 3) Scharer,R., Hossain,Md.M., Do,D.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 679-687(1992)
- 4) Kobayashi *et.al.*, *J.Ferment. Technol.*, **54**, 260-263(1976)
- 5) Stoop,M.L. *et.al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 16-24(1992)
- 6) Santoyo,A.B., Carrasco,J.L.G., Gomez,E.G., Rodriguez,J.B., Morales,E.M., *Biotechnol. Prog.* **9**, 166-173(1993)
- 7) Wheatley,J.A., Moo-Young,M. *Biotechnol. Bioeng.* **19**,219-233(1977)
- 8) Fujii.M., Murakami,S., Yamada,Y., Ona,T. Nakamura,T., *Biotechnol.Bioeng.*, **23**, 1393-1398 (1981).
- 9) Suga,K., van Dedem,G., Moo-Young,M., *Biotechnol.Bioeng.*, **17**, 433-439(1975)
- 10) Okazaki,M., Moo-Young,M., *Biotechnol.Bioeng.*, **20**, 637-663(1978)
- 11) Dean III,S.W., Rollings,J.E., *Biotechnol.Bioeng.*, **39**, 968-976(1992)
- 12) G.W.スミス, コンピュータによる偏微分方程式の解法
- 13) スハス V. パタンカー, コンピュータによる熱移動と流れの数値解析
- 14) Shiraishi,F., *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 150-154(1993)
- 15) Blais,S. and Lortie,R., *J.Biol.Chem.*, **268**, 18637-18639(1993)
- 16) Shiraishi,F. Miyakawa,H., *J.Ferment.Bioeng.*, **77**, 224-228(1994)
- 17) Kimura,S., Nakao,S., Design Methods for Membrane Separation Processes., The Membrane Society of Japan, Kitami Syobo, Tokyo, 1985, pp.37-49.
- 18) Cano,G.V., Cabanes,A.L., *Chem.Eng.J.*, **56**, B61-67(1994)
- 19) Handrikova,G., Stefuca,V., Polakovic,M., Bales,V., *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 581-584 (1996)
- 20) Lortie,R., Andre,G., *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 960-963(1991)
- 21) Jones,I.L., Carta,G., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **32**, 117-125(1993)
- 22) Levenspiel,O., *Chemical Reaction Engineering*, John Wiley & Sons, New York, 1972, pp.253.

Appendix

担体内の物質移動抵抗を考慮しないモデル

まず、モデルの簡単化のため、以下のように仮定する。

- 1) 酵素は球形固定化担体内部に均一に固定化されている。
- 2) 担体内外物質移動抵抗が存在しない。
- 3) Fig.a-1 に示すように担体内外の基質濃度の平衡関係は、分配平衡定数 $H[\text{dm}^3\text{-liq}\cdot\text{dm}^{-3}\text{-particle}]$ を用いて(a-1)式で与えられる。

$$\bar{C}_{Si} = HC_{Si} \quad (i=2,3,4,6) \quad (\text{a-1})$$

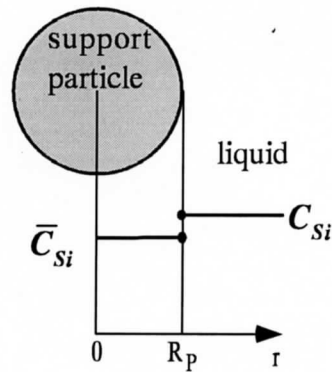


Fig.a-1 Saccharide concentration in immobilized enzyme

この場合、 V_{\max}^{imm} [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{-particle}\cdot\text{min}^{-1}$]、 K_m^{imm} [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{-particle}$]および H を用い、前述した均相酵素反応のモデル式を次式のように表すことができる。

$$\frac{dC_{S_6}}{dt} = \frac{-3(V_{\max}^{\text{imm}}/H)C_{S_6}}{(K_m^{\text{imm}}/H) + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (\text{a-2})$$

$$\frac{dC_{S_4}}{dt} = \frac{(V_{\max}^{\text{imm}}/H)[3(1-\alpha)C_{S_6} - C_{S_4}]}{(K_m^{\text{imm}}/H) + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (\text{a-3})$$

$$\frac{dC_{S_3}}{dt} = \frac{6(V_{\max}^{\text{imm}}/H)\alpha C_{S_6}}{(K_m^{\text{imm}}/H) + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (\text{a-4})$$

$$\frac{dC_{S_2}}{dt} = \frac{(V_{\max}^{\text{imm}}/H)[3(1-\alpha)C_{S_6} + 2C_{S_4}]}{(K_m^{\text{imm}}/H) + 3C_{S_6} + C_{S_4}} \quad (\text{a-5})$$

以上のモデル式の未知定数は V_{\max}^{imm} 、 K_m^{imm} 、 H 、 α の4つである。ここで、 H および α は実験値を用いるため、酵素単位重量当たりの最大反応速度 V_{\max}^{imm} ($=V_{\max}^{\text{imm}}/C_E^{\text{imm}}(0)$)、 K_m^{imm} について実験結果とのフィッティングを行った。